

## NADP-苹果酸酶（NADP-ME）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHF8-M48	NADP-苹果酸酶活性检测试剂盒	48T	微量法
AMHF8-M96		96T	

### 一、测定意义：

NADP-苹果酸酶（NADP-ME）主要用于评估胞质中NADPH的生成与脂代谢稳态：其作为脂肪组织、乳腺等合成型组织中脂肪酸合成的关键NADPH供体，活性变化直接关联肥胖、脂肪肝等脂代谢紊乱疾病的发生发展，可作为解析脂类合成调控机制及代谢综合征的重要指标。

### 二、测定原理：

NADP-苹果酸酶催化下，反应体系中预先加入的还原型辅酶NADPH作为氢供体，参与苹果酸的可逆氧化脱羧反应，伴随自身氧化为NADP<sup>+</sup>；由于NADPH在340nm波长处具有特征性光吸收，而其氧化产物NADP<sup>+</sup>在此波长下无显著吸收，因此通过实时监测340nm处吸光度的下降幅度，可直接反映NADPH的消耗速率，进而定量表征NADP-ME的催化活性。

### 三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(48T)	试剂装量(96T)	保存条件
提取液	液体 50mL×1 瓶	液体 100mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 3mL×1 瓶	液体 6mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 3mL×1 瓶	液体 6mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	-20℃保存
<b>试剂三配制：</b> 用时每瓶粉剂加入蒸馏水 5mL，混匀充分溶解，-20℃保存 1 周，避免反复冻融。			
试剂四	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	-20℃保存
<b>试剂四配制：</b> 用时每瓶粉剂加入蒸馏水 5mL，混匀充分溶解，-20℃保存 1 周，避免反复冻融。			

### 四、操作步骤：

#### 样本前处理

1、组织：按照组织质量（g）：提取液（mL）为1:10 的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆。5000 rpm，4℃离心 10 min，取上清置冰上待测。

2、细菌、细胞：按照细胞数量 10<sup>4</sup> 个：提取液（mL）500~1000:1 的比例（建议 500 万细胞加入 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3s，间隔 7s，总时间 3 min），5000 rpm，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

#### 测定步骤

- 1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至340nm。
- 2、测定前将试剂恢复至常温；
- 3、操作表（在96孔UV板中加入以下试剂）：

试剂名称	测定管	空管
样品（μL）	40	-
双蒸水（μL）	-	40
试剂一（μL）	40	40
试剂二（μL）	40	40
试剂三（μL）	40	40
试剂四（μL）	40	40
充分混匀，记录 340nm 处 20s 时吸光值 A1 和 5min20s 时的吸光值 A2，计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}}$ 。 $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}}$ ； $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ 。（空白管只做 1-2 管）		

#### 五、NADP-苹果酸酶（NADP-ME）活性计算：

1、组织、细胞样本 NADP-苹果酸酶（NADP-ME）计算

(1) 按样本鲜重计算：

**单位定义：**每克组织每分钟消耗 1nmol NADPH 为一个酶活力单位。

**计算公式：**  $\text{NADP-ME (nmol/min/g)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 268 \times \Delta A \div W$

(2) 按样本蛋白浓度计算：

**单位定义：** 每毫克蛋白每分钟消耗 1nmol NADPH 为一个酶活力单位。

**计算公式：**  $\text{NADP-ME (nmol/min/mg)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 268 \times \Delta A \div \text{Cpr}$

(3) 按细菌或细胞数量计算：

**单位定义：** 每 1 万个细菌或细胞每分钟消耗 1nmol NADPH 为一个酶活力单位。

**计算公式：**  $\text{NADP-ME (nmol/10}^4 \text{ cell)} = (U/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 0.536 \times \Delta A$

$V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积， $0.2 \times 10^{-3} \text{ L}$ ； $\epsilon$ ：NADPH， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；

$d$ ：比色皿光径， $0.6 \text{ cm}$ ； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积， $0.04 \text{ mL}$ ； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积， $1 \text{ mL}$ ； $T$ ：反应时间， $5 \text{ min}$ ； $\text{Cpr}$ ：样本蛋白质浓度，

$\text{mg/mL}$ ； $10^9$ ：单位换算系数， $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ ； $W$ ：样本质量， $\text{g}$ ；

500：细菌或细胞总数，500 万。

## 六、 注意事项：

1、实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

2、试剂三对光和热敏感，需分装后 $-20^\circ\text{C}$ 避光冻存，使用前快速解冻并现配现用。

## 【厂家信息】

生产企业：南京陌凡生物科技有限公司

地址：南京市栖霞区红枫科技园 A6 栋 2 层

## 【售后微信】



## 【说明书核准及修改日期】

核准日期：2025 年 4 月 7 日

修改日期：2025 年 4 月 7 日