

线粒体异柠檬酸脱氢酶(NAD-IDH)试剂盒说明书

(货号: BP10397F 紫外法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

线粒体异柠檬酸脱氢酶即 NAD-异柠檬酸脱氢酶 (NAD-IDH EC 1.1.1.41) 广泛存在于动物、植物和培养细胞的线粒体中, 在三羧酸循环中催化异柠檬酸生成 α -酮戊二酸, 同时将 NAD^+ 还原为 NADH, 是三羧酸循环的限速酶之一, 其催化的反应是细胞 NADH 主要来源之一。

NAD-异柠檬酸脱氢酶催化 NAD^+ 还原生成 NADH, 导致 340nm 处光吸收上升, 进而得出 NAD-IDH 酶活性的大小。

二、试剂盒组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 60mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂二	液体 10mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂三	液体 1 支	-20℃避光保存	
试剂四	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂 1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 5mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂六	粉剂 1 瓶	4℃避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 7mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、线粒体制备 (提示: 整个线粒体的提取过程须保持 4℃低温环境):

- ① 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细菌/细胞, 加入 1mL 试剂一, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆, 转移至离心管后于 4℃×700g 离心 10min。弃沉淀, 上清液移至另一离心管中, 4℃×12000g 离心 10min。用移液器移除上清液 (上清液即胞浆提取物, 可用于测定从线粒体泄漏的酶活性 (此步可选做)), 留下沉淀 (沉淀即为线粒体)。在沉淀 (线粒体) 中加入 200 μ L 试剂二和 2 μ L 试剂三, 超声波破碎 (冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 3s, 间隔 10 秒, 重复 30 次), 液体置于冰上用于线粒体 NAD-异柠檬酸脱氢酶活性测定。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 试剂一 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取, 或按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

- ② 液体样品: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

- ③ 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂二; 冰浴超声

波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；4°C×12000g 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴ 个）：试剂二（mL）为 1:1000~5000 比例进行提取。

2、检测步骤：

- ① 紫外分光光度计预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），设定温度 37°C，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温（25°C）。
- ③ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管
样本	60
试剂四	500
试剂五	80
试剂六	100
混匀，37°C 条件下，30s 时于 340nm 处读取 A1 值，30min 后读取 A2 值，ΔA=A2-A1。	

【注】：若 ΔA 在零附近，可以延长反应时间 T（如：60min 或更长），或增加样本量 V1（如 100μL，则试剂四相应减少）。调整后的反应时间 T 或样本体积 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-IDH}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 13.4 \times \Delta A \div W$$

2、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-IDH}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T = 66.1 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

3、按照液体体积计算：

酶活定义：每毫升组织蛋白每小时消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-IDH}(\text{nmol/min/mL}) = \Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div V_1 \div T = 66.1 \times \Delta A$$

4、按细菌或细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-IDH}(\text{nmol/min/10}^4) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.03 \times \Delta A$$

ε---NADH 摩尔消光系数，6.22×10³ L / mol / cm；

d---光径，1cm；

V---加入提取液体积，0.202mL；

V1---加入样本体积，0.06mL；

V2---反应体系总体积，7.4×10⁻⁴ L；

W---样本质量，g；

500---细菌或细胞总数，万；

T---反应时间，30 min；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。