

线粒体异柠檬酸脱氢酶(NAD-IDH)试剂盒说明书

(货号: BP10397W 微板法 96 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 100mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂二	液体 20mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂三	液体 1 支	-20℃避光保存	
试剂四	液体 13mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂 1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 2. 2mL 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. 开盖前注意使粉剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 3. 5mL 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)、96 孔板、离心管、酶标仪、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 组织样本: 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 μL 试剂二和 2 μL 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): 试剂一体积 (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℃×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（ 10^4 个）：试剂二（mL）为 1:1000~5000 比例进行提取。

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），设定温度 37℃，调节波长至 340nm。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）。
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管
样本	20
试剂四	130
试剂五	20
试剂六	30
混匀，37℃条件下，30s 时于 340nm 处读取 A1 值，30min 后读取 A2 值， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【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 40μL，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。

$$\text{NAD-IDH}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 21.7 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{NAD-IDH}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 107.2 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{NAD-IDH}(\text{nmol/min/mL}) = \Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \div V1 \div T = 107.2 \times \Delta A$$

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。

$$\text{NAD-IDH}(\text{nmol/min}/10^4) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.044 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$ ；

d---96 孔板光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，0.202 mL；

V1---加入样本体积，0.02 mL；

V2---反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

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。