

细胞质异柠檬酸脱氢酶(NADP-IDH)试剂盒说明书

(货号: BP10398W 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

细胞质异柠檬酸脱氢酶即 NADP-异柠檬酸脱氢酶 (NADP-IDH, EC 1.1.1.42) 普遍存在于真核及原核生物体内。是细胞质中除了磷酸戊糖途径外又一种 NADPH 来源的重要途径, 在逆境中该酶活性通常会发生显著变化。

本试剂盒提供一种简单, 灵敏, 快速的测定方法: 利用 NADP-IDH 催化 NADP^+ 产生 NADPH, 接着与特异的显色剂反应, 产生在 450nm 处有最大吸收峰的可溶性物质, 通过检测该可溶性物质在 450nm 的增加速率, 进而计算出 NADP-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
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	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 2.2mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	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 3.2mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 1mL×1 支	4℃保存	避光
标准品	粉剂 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

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、样本提取:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃离心 15min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例提取

② 液体样品: 澄清的液体样本直接检测, 若浑浊则离心后取上清检测。

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; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 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); 12000rpm 4℃离心 15min, 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): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、检测步骤：

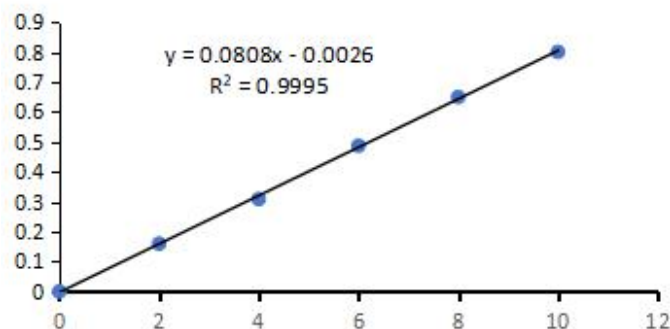
- ① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 450nm。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃），在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	130
试剂二	20
试剂三	30
试剂四	10
混匀，37℃条件下，3min 时于 450nm 处读取 A1 值，避光反应 30min 后读取 A2 值， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】：若 ΔA 过小，可以延长反应时间（如：60min 或更长），或增加样本量（如 30μL，则试剂一相应减少）。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、标准曲线方程：y = 0.0808x - 0.0026，x 是 NADPH 摩尔质量：nmol，y 是 ΔA 。



2、按样本鲜重计算：

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

$$\begin{aligned} \text{NADP-IDH}(\text{nmol/min/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0026) \div 0.0808] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 41.25 \times (\Delta A + 0.0026) \div W \end{aligned}$$

3、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 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NADP-IDH}(\text{nmol/min/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0026) \div 0.0808] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 41.25 \times (\Delta A + 0.0026) \div Cpr \end{aligned}$$

4、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体样本每分钟生成 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-IDH}(\text{nmol/min/mL}) = [(\Delta A + 0.0026) \div 0.0808] \div V1 \div T = 41.25 \times (\Delta A + 0.0026)$$

5、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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-IDH}(\text{nmol/min}/10^4) = [(\Delta A + 0.0026) \div 0.0808] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.0825 \times (\Delta A + 0.0026)$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.01 mL；

W---样本质量，g。

500---细菌或细胞总数，万。

T---反应时间，30 min；若加大了反应时间，则重新调整的反应时间值要代入公式重新计算；

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。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 (1nmol/μL)：向标准品 EP 管里面加入 0.5mL 蒸馏水（母液需在两天内用且-20℃保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. nmol/μL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 制备标准品母液 (1nmol/μL)：向标准品 EP 管里面加入 0.5mL 蒸馏水（母液需在两天内用且-20℃保存）；
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. nmol/μL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下：

标品浓度 nmol/μL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
标品母液 uL	0	40	80	120	160	200
蒸馏水 uL	200	160	120	80	40	0

各标准管混匀待用。

- 5 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	标准管	0 浓度管（仅做一次）
样本	10	
蒸馏水		10
试剂一	130	130
试剂二	20	20
试剂三	30	30
试剂四	10	10

混匀，37℃条件下，3min 时于 450nm 处读取 A1 值，避光反应 30min 后读取 A2 值， $A=A_2-A_1$ ， $\Delta A=A_{\text{标准}}-A_0$ 浓度。