

线粒体异柠檬酸脱氢酶(NAD-IDH)试剂盒说明书

(货号: G0833W 微板法 96 样)

一、产品简介:

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
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 μL ×1 瓶	-20℃保存	
试剂四	液体 13mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂×1 支	4℃保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 2.2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂六	粉剂×1 支	4℃保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 3.5mL 蒸馏水溶解备用。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、低温离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、NAD-异柠檬酸脱氢酶(NAD-IDH)活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1-1、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。
- ② 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)。
- ③ 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): 提取液体积 (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。

1-2、液体样本: 直接检测, 若浑浊则 4℃×12000rpm 离心 10min 后取上清检测。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min 以上, 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:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂四	130
试剂五	20
试剂六	30
混匀, 37°C 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。

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

2、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。

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

3、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。

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

4、按液体样本计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

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

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

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。