

线粒体异柠檬酸脱氢酶(NAD-IDH)试剂盒说明书

(货号: ADS-W-S005 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°C保存	
试剂二	液体 20mL×1 瓶	-20°C保存	
试剂三	液体 1 支	-20°C避光保存	
试剂四	液体 13mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	粉剂 1 瓶	4°C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°C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°C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°C×700g 离心 10min。弃沉淀, 上清液移至另一离心管中, 4°C×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°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 (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°C , 调节波长至 340nm。
- ② 所有试剂解冻至室温 (25°C)。
- 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°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 $40\mu\text{L}$, 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。

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

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。

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

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。

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

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。

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

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。