Cytoplasmic Isocitrate Dehydrogenase Activity Assay Kit

细胞质异柠檬酸脱氢酶(NADP-IDH)试剂盒说明书

货号：BN72599| 方法：可见分光法 | 规格：48 样

一、产品简介：

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 处有最大吸收峰的有色物质，通过检测该有色物质在 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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，再加入 4.2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂三	粉剂 mg×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，再加入 6.4mL 蒸馏水溶解备用。
试剂四	液体 2mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、低温离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、NADP-异柠檬酸脱氢酶活性测定：

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、样本制备：

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 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。

③ 液体样本：澄清的液体直接检测；若浑浊则离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 450nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）

③ 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

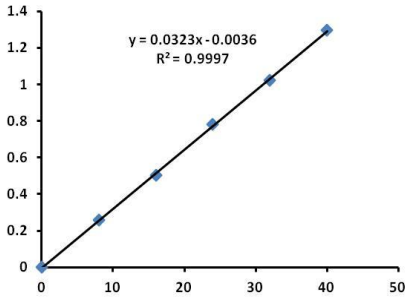
试剂名称（μL）	测定管
样本	40
试剂一	520
试剂二	80
试剂三	120
试剂四	40
混匀，37℃条件下，3min 时于 450nm 处读取 A1 值，避光反应 30min 后读取 A2 值，ΔA=A2-A1。	

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；

针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

1、标准曲线方程：y = 0.0323x - 0.0036，x 是 NADPH 摩尔质量：nmol,y 是ΔA。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

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 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

NADP-IDH(nmol/min/mg prot)=[(ΔA+0.0036)÷0.0323]÷(V1×Cpr)÷T

=25.8×(ΔA+0.0036)÷Cpr

3、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。

NADP-IDH(nmol/min/g 鲜重)=[(ΔA+0.0036)÷0.0323]÷(W×V1÷V)÷T

=25.8×(ΔA+0.0036)÷W

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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

NADP-IDH(nmol/min/10^4)=[(ΔA+0.0036)÷0.0323]÷(500×V1÷V)÷T=0.052×(ΔA+0.0036)

5、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。

NADP-IDH(nmol/min/mL)=[(ΔA+0.0036)÷0.0323]÷V1÷T=25.8×(ΔA+0.0036)

V---加入提取液体积，1 mL；　　V1---加入样本体积，0.04 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。