Mitochondrial Isocitrate Dehydrogenase Activity Assay Kit

线粒体异柠檬酸脱氢酶(NAD-IDH)试剂盒说明书

货号：BN72616 | 方法：微板法 | 规格：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200μL试剂二和2μL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℃条件下，30s 时于 340nm 处读取 A1 值，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、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。

NAD-IDH(nmol/min/mg prot)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10^9]÷(V1×Cpr)÷T=107.2×ΔA÷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。

NAD-IDH(nmol/min/g 鲜重)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10^9]÷(W×V1÷V)÷T=21.7×ΔA÷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。

NAD-IDH(nmol/min/10^4)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10^9]÷(500×V1÷V)÷T=0.044×ΔA

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。

NAD-IDH(nmol/min/mL 液体)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10^9]÷V1÷T=107.2×ΔA

ε---NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 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，2×10^{-4} 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。