

细胞质异柠檬酸脱氢酶(NADP-IDH)试剂盒说明书

(分光法 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 处有最大吸收峰的可色物质, 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°C保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 mg×1 支	4°C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°C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°C保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4°C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°C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°C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 (10⁴): 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°C)

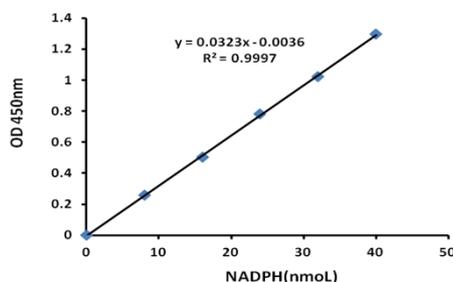
③ 在 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中依次加入：

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°C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】: 若 ΔA 过小, 可以延长反应时间 T (如: 60min 或更长), 或增加样本量 V1 (如 60μL, 则试剂一相应减少)。调整后的 T 或 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

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



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。

$$\begin{aligned} \text{NADP-IDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0036) \div 0.0323] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 25.8 \times (\Delta A + 0.0036) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{NADP-IDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0036) \div 0.0323] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 25.8 \times (\Delta A + 0.0036) \div W \end{aligned}$$

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。

$$\text{NADP-IDH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4) = [(\Delta A + 0.0036) \div 0.0323] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.052 \times (\Delta A + 0.0036)$$

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。

$$\text{NADP-IDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0036) \div 0.0323] \div V1 \div T = 25.8 \times (\Delta A + 0.0036)$$

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。

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 0.6mL 蒸馏水 (母液需在两天内用且 -20°C 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/ μ L。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。
-