

## 线粒体异柠檬酸脱氢酶(NAD-IDH)试剂盒说明书

(紫外分光法 48 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 $\alpha$ -酮戊二酸，同时将  $\text{NAD}^+$  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  $\text{NAD}^+$  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 60mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂二	液体 10mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂三	液体 $\mu\text{L}$ ×1 支	-20℃保存	
试剂四	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部，再加 5mL 蒸馏水溶解备用。
试剂六	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部，再加 7mL 蒸馏水溶解备用。

### 三、所需的仪器和用品：

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿（光径 1cm）、低温离心机、可调式移液器、、研钵、冰和蒸馏水。

### 四、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、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 $\mu\text{L}$ 试剂二和 2 $\mu\text{L}$ 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)：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。

#### 2、上机检测：

- ① 紫外分光光度计预热 30min 以上，设定温度 37℃，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）。
- ③ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	60
试剂四	500
试剂五	80
试剂六	100
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 $\Delta A$  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 100μL, 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。

$$\text{NAD-IDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 66.1 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

### 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。

$$\text{NAD-IDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 13.4 \times \Delta A \div W$$

### 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。

$$\text{NAD-IDH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.03 \times \Delta A$$

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

d---光径, 1cm;

V---加入提取液体积, 0.202mL;

V1---加入样本体积, 0.06mL;

V2---反应体系总体积,  $7.4 \times 10^{-4} \text{ L}$ ;

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。