

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K554-M

产品规格: 96T (80 samples)

检测仪器: 酶标仪(440-460 nm)

## Elabscience<sup>®</sup>NADP-异柠檬酸脱氢酶 (NADP-IDH)

### 比色法测试盒

### NADP-Isocitrate Dehydrogenase (NADP-IDH)

### Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: [biochemical@elabscience.cn](mailto:biochemical@elabscience.cn)

网址: [www.elabscience.cn](http://www.elabscience.cn)

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

## 用途

本试剂盒适用于检测组织、细胞样本中 NADP-异柠檬酸脱氢酶 (NADP-IDH) 的活力。

## 检测原理

异柠檬酸脱氢酶(Isocitrate dehydrogenase, IDH)是三羧酸循环中转化酶之一,在能量代谢、氨基酸维生素合成中扮演重要角色,该酶的辅助因子包括两种 NAD<sup>+</sup>与 NADP<sup>+</sup>,分别处于细胞内不同部位。真核细胞中, NADP<sup>+</sup>依赖型异柠檬酸脱氢酶主要存在于胞浆中。

异柠檬酸脱氢酶在激活剂的激活下将异柠檬酸转化为  $\alpha$ -酮戊二酸,同时将 NADP<sup>+</sup>转化为 NADPH。在电子耦合剂的作用下,生成的 NADPH 在 450 nm 处有特征吸收峰,通过检测其在特定波长下的吸光度可以确定样本中的 NADP-IDH 的酶活力。

本试剂盒检测组织及细胞样本时,需测定总蛋白浓度,推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

## 提供试剂和物品

编号	名称	规格 (96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	50 mL×2 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	1.5 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	促进剂 (Accelerant)	1.5 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 (Chromogenic Agent)	2.5 mL×1 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	10 mmol/L 标准品 (10 mmol/L Standard)	0.5 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板	

	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

## 所需自备物品

**仪器：**酶标仪（波长 440-460 nm，最佳检测波长为 450 nm）、37°C 恒温箱

## 试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 反应工作液的配制：

按照试剂一：试剂二：试剂三 = 34:3:3 的体积比混匀，避光置于冰上备用，配好的工作液在一天内使用有效。

③ 0.5 mmol/L 标准品的配制：

取 50  $\mu\text{L}$  试剂五加入 950  $\mu\text{L}$  双蒸水进行稀释，得到 0.5 mmol/L 的标准品溶液，配好的标准品溶液置于冰上避光待用，8 h 内使用有效。

④ 不同浓度标准品的稀释

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度 (mmol/L)	0	0.1	0.15	0.2	0.3	0.35	0.4	0.5
0.5 mmol/L 标准品 ( $\mu\text{L}$ )	0	40	60	80	120	140	160	200
双蒸水 ( $\mu\text{L}$ )	200	160	140	120	80	60	40	0

## 样本准备

### ① 样本处理

组织样本：按照组织样本质量(g)：试剂一体积(mL)=1:9 比例匀浆，离心(4℃, 10000 ×g, 10 min)，取上清置于冰上待用，留取部分上清液进行蛋白浓度测定。

细胞样本：收集  $1 \times 10^6$  个细胞加入 200 μL 试剂一匀浆(4℃)处理，离心(4℃, 10000 ×g, 10 min)后，取上清置于冰上待用，留取一部分上清液进行蛋白浓度测定。

### ② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.10-50.47 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%大鼠肾组织	10-60	$1 \times 10^6$ 个 CHO 细胞	不稀释
10%大鼠脑组织	5-10	$1 \times 10^6$ 个 RAW 细胞	不稀释
10%大鼠肝组织	10-80	$1 \times 10^6$ 个 293T 细胞	不稀释

注：样本稀释液为试剂一。

## 实验关键点

待测样本需要放置在冰盒上操作。

## 操作步骤

- ① 标准孔:取 20  $\mu\text{L}$  不同浓度的标准品溶液,分别加入相应的酶标孔中。  
测定孔: 取 20  $\mu\text{L}$  待测样本, 分别加入相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①中标准孔和测定孔中加入 120  $\mu\text{L}$  的反应工作液;
- ③ 向步骤②的各孔中依次加入 20  $\mu\text{L}$  的试剂四。
- ④ 振板 3 s, 37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 5 min, 酶标仪于 450 nm 处测得各孔 OD 值为  $A_1$ , 再放入 37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 20 min 后, 酶标仪于 450 nm 处测得各孔 OD 值为  $A_2$ ,  $\Delta A_{\text{测定}}=A_2-A_1$ ,  $\Delta A_{450}=\Delta A_{\text{测定}}-\Delta A_{\text{空白}}$  ( $\Delta A_{\text{空白}}$ : 标准品浓度为 0 时的变化 OD 值)。标准曲线使用孵育后的  $A_2$  测值计算。

## 操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度的标准品 ( $\mu\text{L}$ )	20	--
待测样本 ( $\mu\text{L}$ )	--	20
反应工作液 ( $\mu\text{L}$ )	120	120
试剂四 ( $\mu\text{L}$ )	20	20
振板 3 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 5 min, 酶标仪于 450 nm 处测得各孔 OD 值为 $A_1$ , 再放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min 后, 酶标仪于 450 nm 处测得各孔 OD 值为 $A_2$ , $\Delta A_{\text{测定}}=A_2-A_1$ , $\Delta A_{450}=\Delta A_{\text{测定}}-\Delta A_{\text{空白}}$ ( $\Delta A_{\text{空白}}$ : 标准品浓度为 0 时的变化 OD 值)。标准曲线使用孵育 20 min 后的 $A_2$ 测值计算。		

本试剂盒检测组织或细胞样本时,需测定总蛋白浓度,推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

## 结果计算

标准曲线:  $y = ax + b$

组织和细胞样本中 NADP-IDH 活力计算公式:

定义: 37 °C 条件下, 每克组织或细胞蛋白每分钟催化底物的过程生成 1  $\mu\text{mol}$  NADPH 的所需的酶量为 1 个酶活力单位。

$$\text{NADP-IDH 活力 (U/gprot)} = (\Delta A_{450} - b) \div a \div T \times 1000 \div C_{\text{pr}} \times f$$

注解:

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值 (标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标准曲线的斜率

b: 标准曲线的截距

$\Delta A_{450}$ :  $\Delta A_{450} = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ ,  $\Delta A_{\text{测定}} = A_2 - A_1$  (孵育 5 min 测得 OD 值为  $A_1$ ; 再孵育 20 min 测定 OD 值为  $A_2$ ;  $\Delta A_{\text{空白}}$ : 标准品浓度为 0 时的变化 OD 值,  $\Delta A_{\text{空白}} = A_2 - A_1$ )

T: 反应时间, 20 min

1000: 1 mmol/L = 1000  $\mu\text{mol/L}$

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

$C_{\text{pr}}$ : 待测样本的蛋白浓度, gprot/L

## 附录1 关键数据

### 1. 技术参数

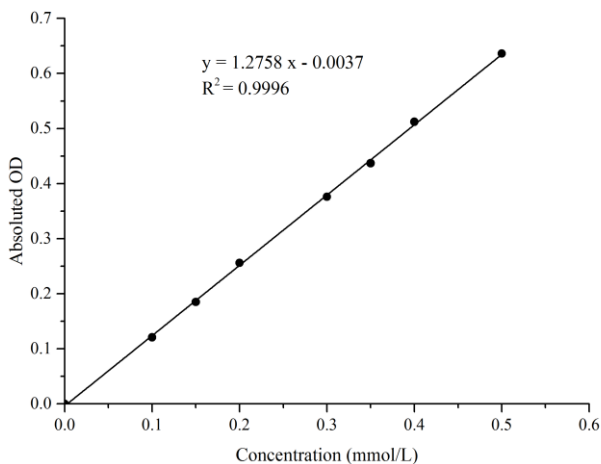
检测范围	0.10-50.47 U/L	批间差	4.3-11.4 %
灵敏度	0.10 U/L	批内差	5.0-6.0 %
稀释回收率	97.0-111 %		

### 2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量20  $\mu$ L，按照操作步骤进行实验，OD值如下表所示：

标准品浓度 (mmol/L)	0	0.1	0.15	0.2	0.3	0.35	0.4	0.5
OD 值	0.056	0.172	0.235	0.310	0.432	0.486	0.563	0.691
	0.047	0.173	0.237	0.305	0.423	0.491	0.564	0.683
平均 OD 值	0.052	0.173	0.236	0.308	0.428	0.489	0.564	0.687
绝对 OD 值	0	0.121	0.185	0.256	0.376	0.437	0.512	0.636

②绘制标准曲线，如下图所示：



## 附录2 实例分析

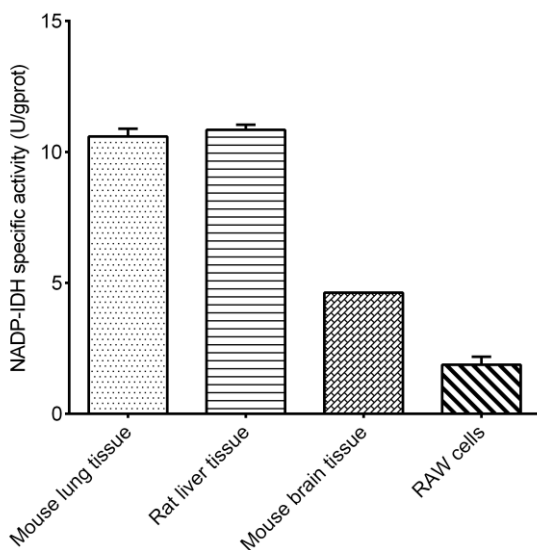
例如检测小鼠肺组织(数据仅供参考):

取稀释10倍的10%的小鼠肺组织20  $\mu\text{L}$ 加入到酶标板孔中,按操作表操作结果如下:

标准曲线:  $y = 1.2758x - 0.0037$ , 测定孔测定值 $A_1$ 为0.391, 测定值 $A_2$ 为0.624, 空白孔变化值 $\Delta A_{\text{空白}}$ 为0.005,  $\Delta A_{450} = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}} = (0.624 - 0.391) - 0.005 = 0.228$ , 测定10%小鼠肺组织匀浆蛋白浓度为8.77  $\text{gprot/L}$ , 计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{NADP-IDH 活性(U/gprot)} &= (0.228 + 0.0037) \div 1.2758 \div 20 \times 1000 \div 8.77 \times 10 \\ &= 10.35 \text{ U/gprot} \end{aligned}$$

按照操作过程,测定小鼠肺组织(10%组织匀浆蛋白浓度8.77  $\text{gprot/L}$ , 稀释10倍, 加样量20  $\mu\text{L}$ )、大鼠肝组织(10%组织匀浆蛋白浓度5.267  $\text{gprot/L}$ , 稀释10倍, 加样量20  $\mu\text{L}$ )、小鼠脑组织(10%小鼠脑组织匀浆蛋白浓度3.616  $\text{gprot/L}$ , 稀释10倍, 加样量20  $\mu\text{L}$ )和RAW细胞( $1 \times 10^6$ 个细胞匀浆蛋白浓度0.182  $\text{gprot/L}$ , 加样量20  $\mu\text{L}$ )和中NADP-IDH活力(如下图):





### 附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本测量结果>50.47 U/L	样本浓度太高	选择合适稀释倍数，重新检测

#### 声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。





