

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: GBQ175

产品规格: 96T (80 samples)

检测仪器: 酶标仪(440-460 nm)

Elabscience®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

网址: 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^+ 与 NADP^+ , 分别处于细胞内不同部位。真核细胞中, NADP^+ 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 α -酮戊二酸,同时将 NADP^+ 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 GBQ162)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°C 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	1.5 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	促进剂 (Accelerant)	1.5 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 (Chromogenic Agent)	2.5 mL×1 瓶	-20°C 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°C 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	96 孔×1 块	无要求

	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 μ L 试剂五加入 950 μ 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 (μ L)	0	40	60	80	120	140	160	200
双蒸水 (μ 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°C, 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 1×10^6 个细胞加入 200 μ L 试剂一匀浆(4°C)处理，离心(4°C, 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	1×10^6 个 CHO 细胞	不稀释
10%大鼠脑组织	5-10	1×10^6 个 RAW 细胞	不稀释
10%大鼠肝组织	10-80	1×10^6 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 μL 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 μL 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 μL 的反应工作液；
- ③ 向步骤②的各孔中依次加入 20 μL 的试剂四。
- ④ 振板 3 s，37°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°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 (μL)	20	--
待测样本 (μL)	--	20
反应工作液 (μL)	120	120
试剂四 (μL)	20	20
振板 3 s，37°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°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 GBQ162)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 μmol 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

ΔA_{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_{pr} : 待测样本的蛋白浓度, gprot/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

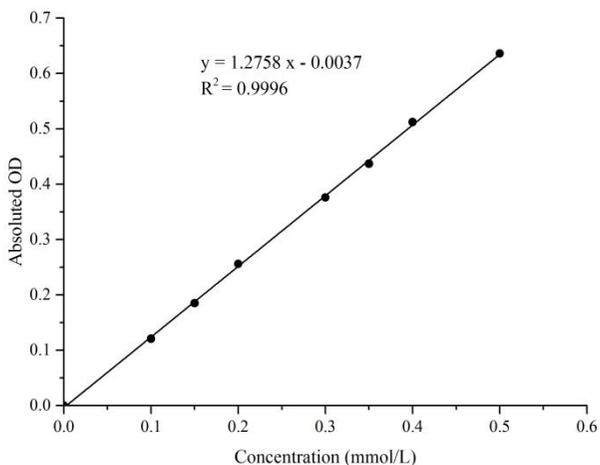
检测范围	0.10-50.47 U/L	批间差	4.3-11.4 %
灵敏度	0.10 U/L	批内差	5.0-6.0 %
稀释回收率	97.0-111 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量20 μ 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

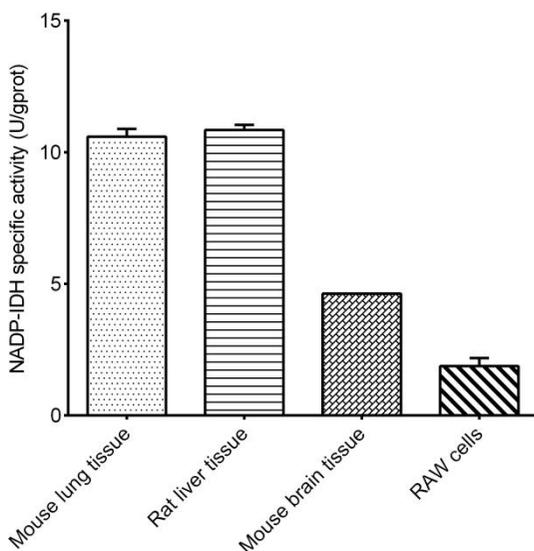
例如检测小鼠肺组织(数据仅供参考):

取稀释10倍的10%的小鼠肺组织20 μL 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 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 gprot/L , 稀释10倍,加样量20 μL)、大鼠肝组织(10%组织匀浆蛋白浓度5.267 gprot/L , 稀释10倍,加样量20 μL)、小鼠脑组织(10%小鼠脑组织匀浆蛋白浓度3.616 gprot/L , 稀释10倍,加样量20 μL)和RAW细胞(1×10^6 个细胞匀浆蛋白浓度0.182 gprot/L , 加样量20 μL)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。

