

(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-K651-M

产品规格: 96T(40 samples)

检测仪器: 酶标仪(440-460 nm)

Elabscience[®]NAD-异柠檬酸脱氢酶

(NAD-IDH)比色法试剂盒

NAD-Isocitrate Dehydrogenase

(NAD-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样本中 NAD-异柠檬酸脱氢酶(NAD-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, 在真核细胞中, NAD^+ -依赖型异柠檬酸脱氢酶主要存在于线粒体中。

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 NAD^+ 转化为 NADH , 在电子耦合剂的作用下, 在 450 nm 处有特征吸收峰, 根据吸光度的大小判断 NAD-IDH 的酶活。

本试剂盒检测组织样本时, 需测定总蛋白浓度, 推荐使用 BCA 法。(货号: E-BC-K318-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	60 mL×2 瓶	-20℃ 保存 3 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	1.6 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 3 个月
试剂三 (Reagent 3)	促进剂 (Accelerant)	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 3 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 (Chromogenic Agent)	3 mL×1 瓶	-20℃ 避光 保存 3 个月
试剂五 (Reagent 5)	标准品 (Standard)	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 3 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(440-460 nm，最佳检测波长 450 nm)，恒温箱(37°C)

试剂准备

① 检测前，试剂平衡至室温。

② 试剂三工作液的配制：

取一支试剂三加入1 mL双蒸水溶解，置于冰上待用，未用完部分分装-20°C可避光保存5天，禁止反复冻融。

③ 反应工作液的配制：

按照试剂一：试剂二：试剂三工作液=31：3：6的体积比混匀，避光置于冰上待用，配好的工作液在1天内使用有效。

④ 1 mmol/L标准品的配制：

取一支试剂五加入1.6 mL双蒸水溶解，置于冰上待用，未用完部分分装-20°C可避光保存5天，禁止反复冻融。

⑤ 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	0.2	0.3	0.4	0.6	0.8	0.9	1
1 mmol/L 标准品(μ L)	0	40	60	80	120	160	180	200
双蒸水(μ L)	200	160	140	120	80	40	20	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：组织样本可使用试剂一匀浆处理，离心取上清待用(也可按照线粒体提取方法制备线粒体样本测定)。留取部分上清进行蛋白浓度测定。

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：0.84-50 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	不稀释	10%小鼠脑组织	不稀释
10%小鼠肾组织	不稀释	10%小鼠心组织	不稀释
10%小鼠肝组织	不稀释	10%大鼠肺组织	不稀释

注：稀释液为试剂一。

操作步骤

- ① 标准孔：取 10 μL 标准品加入标准孔中。
测定孔：取 10 μL 待测样本加入测定孔中。
对照孔：取 10 μL 待测样本加入对照孔中。
- ② 向步骤①中各标准孔和测定孔依次加入 120 μL 反应工作液，各对照孔加入 120 μL 试剂一。
- ③ 向步骤②中各孔依次加入 20 μL 试剂四。
- ④ 振板 3 s，室温避光静置 5 min，酶标仪于 450 nm 波长检测各孔 OD 值 A_1 。37°C 避光孵育 20 min。酶标仪于 450 nm 波长检测各孔 OD 值 A_2 ，计算变化 OD 值 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。标准曲线使用 A_2 值计算。

操作表

	标准孔	测定孔	对照孔
待测样本(μL)	--	10	10
不同浓度的标准品(μL)	10	--	--
反应工作液(μL)	120	120	--
试剂一(μL)	--	--	120
试剂四(μL)	20	20	20
振板 3 s，室温避光静置 5 min，酶标仪于 450 nm 波长检测各孔 OD 值 A_1 。37°C 避光孵育 20 min。酶标仪于 450 nm 波长检测各孔 OD 值 A_2 ，计算变化 OD 值 $A_2 - A_1$ 。标准曲线使用 A_2 值计算。			

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法。(货号：**E-BC-K318-M**)。

结果计算

标准曲线: $y = ax + b$

组织样本中 NAD-IDH 活力计算公式:

定义: 37 °C 条件下, 每克组织蛋白每分钟催化底物的过程生成 1 μmol NADH 的所需的 NAD-IDH 酶量为一个活力单位。

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

注解:

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值), 标准品只需测 A_2 值

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔA_{450} : $\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{对}}$ ($\Delta A = A_2 - A_1$)

T: 孵育反应时间, 20 min

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

C_{pr} : 待测样本蛋白浓度, gprot/L

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

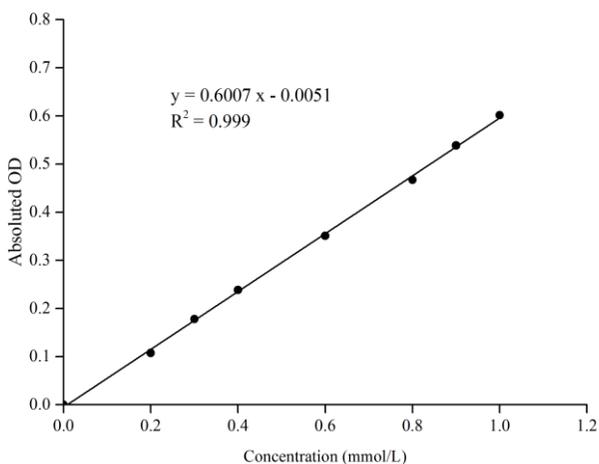
检测范围	0.84-50 U/L	平均批间差	8.6 %
灵敏度	0.84 U/L	平均批内差	5.0 %
平均回收率	97 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量10 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	0.2	0.3	0.4	0.6	0.8	0.9	1
OD 值	0.072	0.18	0.252	0.313	0.432	0.544	0.626	0.671
	0.082	0.189	0.258	0.318	0.424	0.544	0.605	0.686
平均 OD 值	0.077	0.185	0.255	0.316	0.428	0.544	0.616	0.679
绝对 OD 值	0	0.108	0.178	0.239	0.351	0.467	0.539	0.602

② 绘制标曲(如下图):



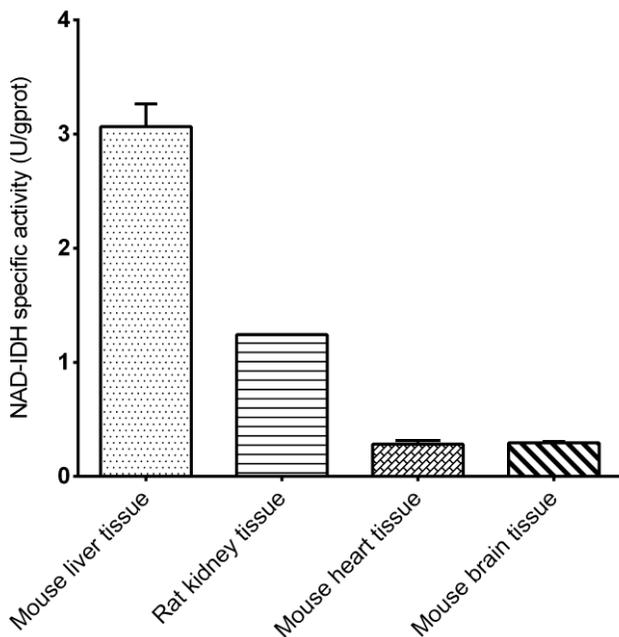
附录2 实例分析

例如检测小鼠肝组织(数据仅供参考):

取10%小鼠肝组织匀浆上清液10 μL , 按操作表操作, 结果如下: 标准曲线: $y = 0.6007x - 0.0051$, 测定孔 $A_1 = 0.457$, 对照孔 $A_1 = 0.583$, 反应20 min后, 测定孔 $A_2 = 1.042$, 对照孔 $A_2 = 0.841$, $\Delta_{\text{测}} = A_2 - A_1 = 0.585$, $\Delta_{\text{对}} = A_2 - A_1 = 0.258$, $\Delta A_{450} = 0.585 - 0.258 = 0.327$, 10%小鼠肝组织匀浆蛋白浓度为8.34 gprot/L计算结果为:

$$\text{NAD-IDH 活力 (U/gprot)} = (0.327 + 0.0051) \div 0.6007 \div 20 \times 1000 \div 8.34 = 3.31 \text{ U/gprot}$$

按照说明书操作, 测定10%小鼠肝组织(蛋白浓度为8.34 gprot/L, 加样量10 μL)、10%大鼠肾组织(蛋白浓度为4.96 gprot/L, 加样量10 μL)、10%小鼠心组织(蛋白浓度为5.34 gprot/L, 加样量10 μL)和10%小鼠脑组织(蛋白浓度为3.56 gprot/L, 加样量10 μL)中NAD-IDH活力(如下图):



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。

