



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

胞浆异柠檬酸脱氢酶(ICDHc)活性检测试剂盒 (分光光度法)

货号: R41933

规格: 50T/48S

有效期: 6个月

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液ES07	60mL×1瓶	2-8℃保存;
试剂-A	50mL×1瓶	2-8℃保存; 用前置于37℃(哺乳动物)或25℃ (其它物种)水浴中预热10min左右。
试剂-B	粉剂×1支	2-8℃保存; 用时加550μL蒸馏水充分溶解 备用; 溶解后2-8℃可保存一周。
试剂-C	粉剂×1支	-20℃保存; 用时加550μL蒸馏水充分溶解备用; 现配现用。

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

简介

意义: 异柠檬酸脱氢酶 (isocitrate dehydrogenase, IDH, EC 1.1.1.42) 在三羧酸 (TCA) 循环中将异柠檬酸转化为 α -酮戊二酸, 将 NAD^+ 或 NADP^+ 还原成 NADH 或 NADPH 。在真核生物中, IDH 有三种同工酶, 线粒体 IDH2 和 IDH3, 细胞质/过氧化物酶体 IDH1。所有三个 IDH 家族成员的酶活性都要求存在二价阳离子 (Mg^{2+} 或 Mn^{2+})、电子接受辅因子 NADP^+ (IDH1 和 IDH2) 或 NAD^+ (IDH3)。IDH 对生物体的能量代谢、生物合成以及抗氧化胁迫起重要作用。目前 IDH 是研究蛋白质的结构与功能关系、酶的催化与调节机制、蛋白质功能进化的最好模型之一。



原理: 异柠檬酸脱氢酶活性测定试剂盒提供了一种简单、直接的方法, 用于测定各种样品中胞浆异柠檬酸脱氢酶 (ICDHc, Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic) 活性。利用 ICDHc 催化 NADP⁺还原成 NADPH 的反应, 在 340 nm 下测定 NADPH 浓度的增加。

自备用品:

紫外分光光度计、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

样本的前处理:

1. 细菌、细胞样品的制备:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液 ES07 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液 ES07), 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); 8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2. 组织样品的制备:

按照组织质量 (g): 提取液 ES07 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液 ES07), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

3. 血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤:

1. 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
2. 将 试剂-A 置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴中预热 10min 左右。
3. 工作液配制: 将 试剂-A、试剂-B、试剂-C 按 85: 1: 1 的比例混合。
4. 在 1mL 玻璃比色皿中按顺序加入下列试剂

试剂名称	测定管 (μL)
工作液	950
样本	50



将上述试剂按顺序加入1 mL石英比色皿中, 加样本的同时开始计时; 混匀, 在340nm波长下记录20s时的初始吸光度A1和2min 20s时的吸光度A2, 计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

注意事项:

1. 若 $A_2 - A_1$ 大于 0.5, 需将酶液用提取液稀释, 使 $A_2 - A_1$ 小于 0.5, 可提高检测灵敏度, 并在计算公式中乘以相应稀释倍数。
2. 若 $A_2 - A_1$ 小于 0.005, 可延长反应时间到 5min 或 10min。

ICDHc 活力单位的计算:

1. 血清(浆) ICDHc 活力的计算:

单位的定义: 每mL血清(浆)每分钟生成1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样本}} \div T = 1608 \times \Delta A$$

2. 组织、细菌或细胞中 ICDHc 活力的计算

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每mg组织蛋白每分钟生成1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每g组织每分钟生成1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义: 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。

$$\text{ICDHc (U/10}^4 \text{ Cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样本}} \times 500) \div T = 3.2 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 10^{-3} L; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.05 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL; T : 反应时间, 2 min; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。