



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

货号: R41934

规格: 100T/96S

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	120mL×1瓶	2-8℃保存;
试剂-A	20mL×1瓶	2-8℃保存;
试剂-B	粉剂×1支	2-8℃保存; 用时加275μL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275μL蒸馏水充分溶解 备用; 溶解后2-8℃可保存一周。

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/酶标仪、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板（UV板）、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/酶标仪预热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，现配现用。
4. 按顺序加入下列试剂

试剂名称	测定管(μL)
工作液	190
样本	10

将上述试剂按顺序加入，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 $\Delta A = A2 - A1$ 。

注意事项:

1. 若 $A2 - A1$ 大于 0.5，需将酶液用提取液稀释，使 $A2 - A1$ 小于 0.5，可提高检测灵敏度。计算公式中乘以相应稀释倍数。



2. 若 A2-A1 小于 0.005, 可延长反应时间到 5min 或 10min。
3. 实验时, 试剂 B、试剂 C 和样本在冰上放置, 以免变性和失活; 工作液 37℃ 水浴放置。

ICDHc 活力单位的计算:

一、按微量石英比色皿计算:

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。

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

注: V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.01 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 2 min; Cpr: 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

二、按 96 孔板计算:

将上述公式中光径 d-96 孔板光径改为 0.5cm。