



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

线粒体异柠檬酸脱氢酶(ICDHm)活性检测试剂盒 (微量法)

货号: R41970

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
试剂-A	100mL×1瓶	-20℃保存;
试剂-B	20mL×1瓶	-20℃保存;
试剂-C	1.5mL×1支	-20℃保存;
试剂-D	20mL×1瓶	2-8℃保存;
试剂-E	粉剂×1支	2-8℃保存;
试剂-F	粉剂×1支	-20℃保存;
工作液配制: 临用前把试剂-E,F转移至试剂-D中充分溶解待用; 剩余试剂2-8℃保存一周有效;		
试剂-G	粉剂×1支	-20℃保存; 临用前加入1mL蒸馏水充分混匀待用, 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: 线粒体异柠檬酸脱氢酶 (Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial; ICDHm; ICD-M; EC 1.1.1.41) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞的线粒体中, 在三羧酸循环中催化异柠檬酸生成 α -酮戊二酸, 同时将 NAD⁺ 还原为 NADH, 是三羧酸循环的限速酶之一, 其催化的反应是细胞 NADH 主要来源之一。

原理: ICDHm 催化 NAD⁺ 还原生成 NADH, 导致 340nm 处光吸收上升。

自备用品:

紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、蒸馏水。

样本的前处理:



组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离:

1. 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细菌或细胞, 加入 1mL 试剂-A 和 10uL 试剂-C, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
 2. 将匀浆 600g, 4℃离心 5min。
 3. 弃沉淀, 将上清液移至另一离心管中, 11000g, 4℃离心 10min。
 4. 上清液即胞浆提取物, 可用于测定从线粒体泄漏的 ICDHm (此步可选做)。
 5. 在步骤4的沉淀中加入 200uL 试剂-B和 2uL 试剂-C, 超声波破碎 (冰浴, 功率 20%或200W, 超声 3 秒, 间隔 10 秒, 重复 30 次), 用于线粒体 ICDHm 活性测定
- 测定步骤:**

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
2. 工作液于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 孵育 5min。
3. 在微量石英比色皿/96 孔板中按下表依次加入:

试剂名称	测定管(ul)
试剂-G	10
样本	10
工作液	180

混匀, 立即记录340nm处20s时的吸光值A1和2min 20s时的吸光值A2,计算 $\Delta A = A2 - A1$

ICDHm 活性计算:

- a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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 的NADH 定义为一个酶活性单位。

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

2. 按样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{ICDHm 活性 (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 325 \times \Delta A \div W$$

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 NADH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{ICDHm 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.65 \times \Delta A$$

注: V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : NADH 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, 0.202 mL; T: 反应时间, 2min; 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。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

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 的 NADH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{ICDHm 活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 3216 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按样本鲜重计算

单位的定义: 每g 组织每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{ICDHm 活性 (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 650 \times \Delta A \div W$$

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 NADH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{ICDHm 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.3 \times \Delta A$$

注: V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.01 mL; V 样总: 加入提取液体积, 0.202 mL; T: 反应时间, 2min; 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。