

胞浆异柠檬酸脱氢酶 (ICDHc) 活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

货号: AC10144

规格: 50T/48S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 100 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×2 支	4°C保存
试剂三	粉剂×2 支	4°C保存

溶液的配制:

1. 试剂一: 用时加入 50 mL 提取液溶解;
2. 试剂二: 用时每支加 275 μ L 双蒸水充分溶解备用;
3. 试剂三: 用时每支加 275 μ L 双蒸水充分溶解备用;
4. 工作液配制: 将试剂一、试剂二、试剂三按 85: 1: 1 的比例混合, 现用现配。

产品说明:

ICDHc (EC 1.1.1.42) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 催化异柠檬酸脱氢脱羧生成 α -酮戊二酸, 同时还原 NADP^+ 生成 NADPH 。ICDHc 是细胞质中除了磷酸戊糖途径外又一种 NADPH 重要来源, 在逆境中该酶活性通常会发生显著变化。

利用 ICDHc 催化 NADP^+ 还原成 NADPH 反应, 在 340nm 下测定 NADPH 浓度的增加, 即可反映 ICDHc 活性。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

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

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

1、细菌、细胞或组织样本的制备:

细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照每 200 万细菌或细胞加入 400 μ L 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (功率 20%, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 8000g 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

组织: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆。8000g 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、血清 (浆) 样本: 直接检测。

二、测定步骤

1. 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
2. 按下表步骤加样:

试剂名称 (μL)	测定管
工作液 (μL)	950
样本 (μL)	50

将上述试剂按顺序加入 1mL 石英比色皿中，加样本的同时开始计时，在 340nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A1；迅速将比色皿连同反应液一起放入 37°C 水浴中，准确反应 2 分钟，迅速取出比色皿并擦干，记录 2 分 20 秒时的吸光度 A2。计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

三、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）在反应体系中每分钟生成 1nmol 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 组织蛋白在反应体系中每分钟生成 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

(2) 按样本质量计算：

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟生成 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

3、细菌或培养细胞中 ICDHc 活力的计算

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟生成 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

(2) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟生成 1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

V 反总：反应总体积，0.001L； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；d：石英比色皿光径，1cm；V 样本：加入样本体积，0.05mL；V 提取：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：反应时间，2min；500：细菌或细胞密度，500 万/mL。

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。若初始值 A1 大于 0.5 可尝试将酶液用提取液稀释。
- 2、实验时，试剂二、试剂三和样本在冰上放置，以免变性和失活；工作液 37°C 水浴放置。
- 3、比色皿中反应液的温度必须保持 37°C，取小烧杯一只装入一定量的 37°C 蒸馏水，将此烧杯放入 37°C 水浴锅中。在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中。
- 4、最好两个人同时做此实验，一个人比色，一个人计时，以保证实验结果的准确性。

实验实例：

1. 取 0.1g 稗草，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，然后 8000g 4°C 离心 10min，取上清，之后按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A = A2 - A1 = 0.240 - 0.224 = 0.016$ ，按样本质量计算酶活得：

ICDHc (U/g 质量) = $1608 \times \Delta A \div W = 257.28$ U/g 质量。

2. 取 0.1g 小鼠肺部组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，然后 8000g 4°C 离心 10min，取上清稀释 5 倍，之后按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.253 - 0.141 = 0.112$ ，按样本质量计算酶活得：

ICDHc (U/g 质量) = $1608 \times \Delta A \div W \times 5 = 9004.8$ U/g 质量。

3. 取小鼠血清样本直接检测，测得计算 $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.225 - 0.2 = 0.025$ ，按血清计算得：

ICDHc (U/mL) = $1608 \times \Delta A = 40.2$ U/mL。

参考文献：

[1] Miake F, TORIKATA T, KOGA K, et al. Isolation and characterization of NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase from the pupa of *Bombyx mori*[J]. The Journal of Biochemistry, 1977, 82(2): 449-454.