

胞浆异柠檬酸脱氢酶(ICDHc)活性检测试剂盒说明书

Isocitrate Dehydrogenase Activity Assay Kit

分光光度法

货号: AK286

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES07	60mL×1 瓶	4℃保存;
AK286-A	50mL×1 瓶	4℃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。
AK286-B	粉剂×1 支	4℃保存; 用时加 550μL 蒸馏水充分溶解备用; 溶解后 4℃可保存一周。
AK286-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 (Mg²⁺或 Mn²⁺)、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 (10⁴ 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 AK286-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 AK286-A、AK286-B、AK286-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。

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

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每g 组织每分钟生成1 nmol 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。

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

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; 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