

线粒体异柠檬酸脱氢酶(ICDHm)活性检测试剂盒说明书

ICDHm Activity Assay Kit

紫外分光光度法

货号: AK328

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK328-A	50mL×1 瓶	-20℃保存;
AK328-B	10mL×1 瓶	-20℃保存;
AK328-C	1mL×1 支	-20℃保存;
AK328-D	60mL×1 瓶	4℃保存;
AK328-E	粉剂×1 支	4℃保存;
AK328-F	粉剂×1 支	-20℃保存;
工作液配制: 临用前把 AK328-E, F 转移至 AK328-D 中充分溶解待用; 剩余试剂 4℃保存一周有效;		
AK328-G	粉剂×1 支	-20℃保存; 临用前加入 3mL 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、1cm 石英比色皿、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、冰和蒸馏水。

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 AK328-A 和 10uL AK328-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 AK328-B 和 2uL AK328-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. 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm 处, 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 1mL 石英比色皿中依次加入

试剂名称	测定管 (ul)
AK328-G	60
样本	80

工作液	1000
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 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。	

ICDHm 活性计算：

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 的NADH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{ICDHm 活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 1145 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{ICDHm 活性 (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 231.3 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{ICDHm 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.463 \times \Delta A$$

注： V 反总：反应体系总体积， 1.14×10^{-3} 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，0.08 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； 10^9 :单位换算系数，1 mol = 10^9 nmol。