

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

微量法

货号: AK329

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK329-A	100mL×1 瓶	-20℃保存;
AK329-B	20mL×1 瓶	-20℃保存;
AK329-C	1.5mL×1 支	-20℃保存;
AK329-D	20mL×1 瓶	4℃保存;
AK329-E	粉剂×1 支	4℃保存;
AK329-F	粉剂×1 支	-20℃保存;
工作液配制: 临用前把 AK329-E, F 转移至 AK329-D 中充分溶解待用; 剩余试剂 4℃保存一周有效;		
AK329-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 AK329-A 和 10uL AK329-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 AK329-B 和 2uL AK329-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)
AK329-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 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。	

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： $V_{\text{反总}}$ ：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； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，0.202 mL； T ：反应时间，2min； C_{pr} ：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， $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

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。

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

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。

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

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： $V_{\text{反总}}$ ：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； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，0.202 mL； T ：反应时间，2min； C_{pr} ：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， $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。