

线粒体异柠檬酸脱氢酶 (ICDHm) 活性检测试剂盒检测试剂盒 (分光光度计法)
(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0378	线粒体异柠檬酸脱氢酶 (ICDHm) 活性检测试剂盒	50 管/48 样

产品内容

名称	规格	储存条件
试剂一	液体 50mL × 1 瓶	-20℃
试剂二	液体 10mL × 1 瓶	-20℃
试剂三	液体 1mL × 1 瓶	-20℃
试剂四	液体 60mL × 1 瓶	4℃
试剂五	粉剂 × 1 支:	4℃
试剂六	粉剂 × 1 支:	-20℃
试剂七	粉剂 × 1 支: 临用前加入 3mL 蒸馏水充分混匀待用; 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。	-20℃

工作液的配制: 临用前把试剂五、试剂六转移到试剂四中混合溶解待用; 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。

一、产品说明

ICDHm (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。

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

二、自备材料

天平、研钵、离心机、可见分光光度计、恒温水浴锅、1mL 石英比色皿、蒸馏水。

三、样本前的处理 ((组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离)) :

- 1、称取 0.1g 样本或收集 500 万细胞, 加入 1mL 试剂一和 10 μ L 试剂三, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 2、将匀浆液 4℃ 600g 离心 5min。
- 3、留取沉淀, 将上清液转移至另一离心管, 4℃ 11000g 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、向步骤 3 中的沉淀加入 200 μ L 试剂二和 2 μ L 试剂三, 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 的测定。

四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调解波长至 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 1mL 石英比色皿中依次加入 60 μ L 试剂七、80 μ L 样本和 1mL 工作液, 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 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

五、活性的计算

1、按照样本蛋白浓度计算:

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。

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

2、按照样本鲜重计算:

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。

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

3、按照细胞/细菌密度计算:

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。

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

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。