

线粒体异柠檬酸脱氢酶 (ICDHm) 活性检测试剂盒 (微量法)  
(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
YFX0379	线粒体异柠檬酸脱氢酶 (ICDHm) 检测试剂盒 (微量法)	100 管/96 样

### 产品内容

名称	规格	储存条件
试剂一	液体 100mL × 1 瓶	-20℃
试剂二	液体 20mL × 1 瓶	-20℃
试剂三	液体 1.5mL × 1 瓶	-20℃
试剂四	液体 20mL × 1 瓶	4℃
试剂五	粉剂 × 1 支: 使用前加入 18mL 试剂四充分溶解, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 10min; 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。	4℃
试剂六	粉剂 × 1 支: 使用前加入 1mL 蒸馏水, 充分溶解待用; 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。	-20℃

## 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 $\alpha$ -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

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

## 三、样本前处理 (组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离) :

- 1、称取 0.1g 样本或收集 500 万细胞, 加入 1mL 试剂一和 10 $\mu$ 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 $\mu$ L 试剂二和 2 $\mu$ 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、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调解波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 2、在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 $\mu$ L 样本、10 $\mu$ L 试剂六、180 $\mu$ L 试剂五, 充分混匀, 立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值  $A_1$  和 2min 20s 时的吸光值  $A_2$ , 计算  $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

## 五、活性的计算

### A. 用 96 孔板测定的计算公式如下:

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 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活性单位。

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

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。

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

3、按照细胞/细菌密度计算:

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

ICDHm 活性 (nmol/min/ $10^4$  ceLL) =  $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$   
=  $1.3 \times \Delta A$ 。

V 反总: 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  L / mol / cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.01 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。

### B. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下:

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。

ICDHm 活性 (nmol/min/mg prot) =  $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T$   
=  $1608 \times \Delta A \div \text{Cpr}$ 。

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。

ICDHm (nmol/min/g 鲜重) =  $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$  =  $325 \times \Delta A \div W$ 。

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。

ICDHm 活性 (nmol/min/ $10^4$  ceLL) =  $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$   
=  $0.65 \times \Delta A$ 。

V 反总: 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  L / mol / cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.01 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。