

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:

可见分光光度计/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:

- 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细菌或细胞, 加入 1mL AK329-A 和 10 μ L AK329-C, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 将匀浆 600g, 4℃离心 5min。
- 弃沉淀, 将上清液移至另一离心管中, 11000g, 4℃离心 10min。
- 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)。
- 在步骤 4 的沉淀中加入 200 μ L AK329-B 和 2 μ L 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

- 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。
- 工作液于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 孵育 5min。
- 在微量石英比色皿/96 孔板中依次加入

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。

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

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。

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

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。

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

注: V 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 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 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。

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

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。

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

3. 按细菌或细胞密度计算

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。

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

注: V 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 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。