

胞浆异柠檬酸脱氢酶 (ICDHc) 试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

ICDHc (EC 1.1.1.42) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 催化异柠檬酸脱氢脱羧生成 α -酮戊二酸, 同时还原 NADP^+ 生成 NADPH。ICDHc 是细胞质中除了磷酸戊糖途径外又一种 NADPH 重要来源, 在逆境中该酶活性通常会发生显著变化。

测定原理:

利用 ICDHc 催化 NADP^+ 还原成 NADPH 反应, 在 340 nm 下测定 NADPH 浓度的增加。

所需的仪器和用品:

紫外分光光度计/酶标仪、恒温水浴锅、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。

试剂的组成和配制:

提取液: 液体 100mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 液体 19 mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 粉剂×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂三: 粉剂×1 瓶, -20℃ 保存;

样本的前处理:

1、细菌、细胞或组织样品的制备:

细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液), 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

组织: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、血清 (浆) 样品: 直接检测。

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、将试剂二和试剂三转移至试剂一中充分溶解; 在 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 10min 以上; 用不完的试剂分装后 -20℃ 保存, 禁止反复冻融。

3、在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μ L 样本和 190 μ L 试剂一, 混匀后立即记录 340nm 处 20s 后吸光值 A1 和 2min20s 后的吸光值 A2, 计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

注意事项:

1、若 $A2 - A1$ 大于 0.5, 需将酶液用提取液稀释, 使 $A2 - A1$ 小于 0.5, 可提高检测灵敏度。计算公式中乘以相应稀释倍数。

2、若 $A2 - A1$ 小于 0.005, 可延长反应时间到 5min 或 10min。

ICDHc 活力单位的计算:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、血清 (浆) ICDHc 活力的计算:

单位的定义: 每 mL 血清 (浆) 每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1608 \times \Delta A$$

2、组织、细菌或细胞中 ICDHc 活力的计算:

(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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 1608 \times \Delta A \div W$$

(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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (nmol/min/10}^4) = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 3.216 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : NADPH 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, 1 mL; T: 反应时间, 2 min; 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、血清(浆) ICDHc 活力的计算:

单位的定义: 每 mL 血清(浆) 每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T = 3216 \times \Delta A$$

2、组织、细菌或细胞中 ICDHc 活力的计算:

(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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 3216 \times \Delta A \div W$$

(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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (nmol/min/10}^4) = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 6.432 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : NADPH 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, 1 mL; T: 反应时间, 2 min; 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。