

胞浆异柠檬酸脱氢酶 (ICDHc) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 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、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制:

提取液: 60mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 液体 50 mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 粉剂×1 支, 4℃ 保存;

试剂三: 粉剂×1 支, 4℃ 保存;

试剂四: 粉剂×1 支, -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、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 2、将试剂二转移至试剂一中充分溶解, 置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴中预热 10min 左右; 用不完的试剂 4℃ 保存。
- 3、在试剂三中加入 550 μ L 蒸馏水充分溶解, 置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴中预热 10min 左右; 用不完的试剂分装后 -20℃ 保存, 禁止反复冻融。
- 4、在试剂四中加入 550 μ L 蒸馏水充分溶解, 置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴中预热 10min 左右; 用不完的试剂分装后 -20℃ 保存, 禁止反复冻融。
- 5、操作表:

试剂名称 (μ L)	测定管
试剂一	750
试剂三	10
试剂四	10
样本	30

将上述试剂按顺序加入 1 mL 石英比色皿中, 加样本的同时开始计时; 混匀, 在 340nm 波长

订购电话: 0512-62956165 技术支持: 18015581827 投诉电话: 18112525205

下记录 20s 时的初始吸光度 A1 和 2min20s 时的吸光度 A2，计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

注意事项：

- 1、若 $A_2 - A_1$ 大于 0.5，需将酶液用提取液稀释，使 $A_2 - A_1$ 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 $A_2 - A_1$ 小于 0.005，可延长反应时间到 5min 或 10min。

ICDHc 活力单位的计算：

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。

$$\text{ICDHc (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 2143 \times \Delta A$$

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。

$$\text{ICDHc (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 2143 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{ICDHc (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2143 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{ICDHc (nmol/min/10}^4) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 4.285 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 8×10^{-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，0.03 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。