

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。

组成:

产品名称	AE005-50T/48S	Storage
提取液:	60ml	4°C
试剂一: 液体	50ml	4°C
试剂二: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂三: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂四: 粉剂	1 瓶	-20°C
说明书	一份	

自备仪器和用品:

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。

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°C 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°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、血清 (浆) 样品: 直接检测。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



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°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴中预热 10min 左右; 用不完的试剂 4°C 保存。
- 3、在试剂三中加入 550 μ l 蒸馏水充分溶解, 置于 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴中预热 10min 左右; 用不完的试剂分装后 -20°C 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°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴中预热 10min 左右; 用不完的试剂分装后 -20°C 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 波长下记录 20s 时的初始吸光度 A1 和 2min20s 时的吸光度 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:

- 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。

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

- (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。

