

## 线粒体异柠檬酸脱氢酶 (ICDHm) 活性测定试剂盒说明书

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:

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  $\text{NAD}^+$  还原为  $\text{NADH}$ , 是三羧酸循环的限速酶之一, 其催化的反应是细胞  $\text{NADH}$  主要来源之一。

### 测定原理:

ICDHm 催化  $\text{NAD}^+$  还原生成  $\text{NADH}$ , 导致 340nm 处光吸收上升。

### 组成:

产品名称	KC007-50T/48S	Storage
试剂一: 液体	50ml	-20°C
试剂二: 液体	10ml	-20°C
试剂三: 液体	1ml	-20°C
试剂四: 液体	60ml	4°C
试剂五: 粉剂	1 支	4°C
试剂六: 粉剂	1 支	-20°C
试剂七: 粉剂	1 支	-20°C
说明书	一份	

试剂七: 粉剂 $\times$ 1 支, -20°C 保存; 临用前加入 3ml 蒸馏水充分混匀待用; 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融。

**工作液的配制:** 临用前把试剂五、试剂六转移到试剂四中混合溶解待用; 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融。

### 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:

- 1、称取约 0.1g 组织或收集 500 万细菌或细胞, 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 600g, 4°C 离心 5min。
- 3、弃沉淀, 将上清液移至另一离心管中, 11000g, 4°C 离心 10min。

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



- 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、在步骤④的沉淀中加入 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 活性测定。

### 测定步骤：

- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm 处，蒸馏水调零。
- 2、工作液于 37 $^{\circ}$ C（哺乳动物）或 25 $^{\circ}$ C（其它物种）孵育 5min。
- 3、在 1ml 石英比色皿中依次加入 60 $\mu$ l 试剂七、80 $\mu$ l 样本和 1ml 工作液，混匀，立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A1 和 2min20s 时的吸光值 A2，计算 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

### ICDHm 活性计算：

- (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 的 NADH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{ICDHm 活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1145 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

- (2) 按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{ICDHm (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 231.3 \times \Delta A \div W$$

- (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。

$$\text{ICDHm 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.463 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，1.14 $\times 10^{-3}$  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，0.08 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。

