

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°C保存；

试剂一：液体19 mL×1瓶，4°C保存；

试剂二：粉剂×1瓶，4°C保存；

试剂三：粉剂×1瓶，-20°C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°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。

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°C（哺乳动物）或25°C（其它物种）水浴10min以上；用不完的试剂分装后-20°C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 $\Delta A=A2-A1$ 。

胞浆异柠檬酸脱氢酶（ICDHc）试剂盒说明书注意事项：

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。

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

(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。

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

(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。

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

(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。

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

(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。

www.pyram.cn