

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0591

Size: 50T/48S

胞浆异柠檬酸脱氢酶 (ICDHc) 检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、测定原理:

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

三、需自备的仪器和用品:

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。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	60mL × 1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 50mL × 1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 × 1 支	4℃保存	用时加 550 μ L 蒸馏水充分溶解备用; 溶解后 4℃可保存一周
试剂三	粉剂 × 1 支	-20℃保存	用时加 550 μ L 蒸馏水充分溶解备用; 现配现用

五、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。

六、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、将试剂一置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴中预热 10min 左右。

3、操作表：

试剂名称（ μ L）	测定管
试剂一	750
试剂二	10
试剂三	10
样本	30

将上述试剂按顺序加入 1mL 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 2min 20s 时的吸光度 A2，计算 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

七、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。

八、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。

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

（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。

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

（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。

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

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。