

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-S0665

Size: 50T/24S

线粒体异柠檬酸脱氢酶 (ICDHm) 检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定，（如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测）。

一、测定意义：

线粒体异柠檬酸脱氢酶 (isocitrate dehydrogenase, ICDHm)，广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞的线粒体中，与线粒体基因表达及线粒体其他的功能有关。异柠檬酸脱氢酶在生物体内有两种存在形式，以 NAD 为辅酶的 NAD-依赖型异柠檬酸脱氢酶，和以 NADP 为辅酶的 NADP-依赖型异柠檬酸脱氢酶。

二、测定原理：

异柠檬酸脱氢酶的主要功能，是在体内三羧酸循环中，催化异柠檬酸生成 α -酮戊二酸，将 NAD 还原成 NADH，通过测定 α -酮戊二酸的生成量，可以计算出线粒体异柠檬酸脱氢酶活力高低。

三、需自备的仪器和用品：

低温离心机、可见分光光度计、水浴锅/恒温培养箱、1mL 玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、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
提取液一	液体 45 mL×1 瓶	4℃保存	
提取液二	液体 600 μL×2 支	-20℃保存	
提取液三	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	常温保存	
试剂三	液体 20 mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉剂×2 支	-20℃保存	
试剂五	液体 10 mL×1 瓶	常温保存	
试剂六	液体 35 mL×1 瓶	常温保存	
标准品	粉剂×1 支	4℃保存	

溶液的配制：

- 1、提取液二：易挥发试剂，用完后盖紧盖儿后及时放回-20℃保存；
- 2、试剂一：临用前加入 10 mL 试剂三，充分溶解待用；
- 3、试剂二：临用前加入 10 mL 试剂三，充分溶解待用；
- 4、试剂四：临用前加入 0.75 mL 双蒸水，充分溶解待用；
- 5、工作液的配制：临用前根据用量将试剂一、试剂二按 1:1 比例混合，现配现用；
- 6、标准品：10 mg α-酮戊二酸。临用前加入 684 μL 蒸馏水，配成 100 μmol/mL 标准液。

五、操作步骤：

● 样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 称取约 0.3g 组织或收集 1500 万细胞，加入 1.5mL 提取液一和 15 μ L 提取液二，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
2. 4℃，1000g 离心 10min。将上清液移至另一离心管中，4℃，11000g 离心 15min。
3. 上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的异柠檬酸脱氢酶（此步可选做，可以判断线粒体提取效果）。
4. 在沉淀中加入 600 μ L 提取液三和 6 μ L 提取液二，超声波破碎（功率 40%，超声 5 秒，间隔 9 秒，4min），4℃，10000g 离心 10min，取上清液用于线粒体异柠檬酸脱氢酶活性测定，并且用于蛋白含量测定。

● 测定步骤

- 1、可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 505nm，蒸馏水调零。
- 2、将标准品用提取液三稀释至 0.6、0.3、0.15、0.075、0.0375、0.01875 μ mol/mL 标准溶液。
- 3、操作表（在 1.5 mL EP 管中进行如下操作）：

试剂名称（ μ L）	对照管	测定管	标准管	空白管
上清液	200	200	—	
标准溶液			200	
工作液	200	200	200	200
试剂四	—	20	20	20
蒸馏水	20			200
充分混匀，置于 37℃ 水浴锅/37℃ 恒温培养箱中反应 1h				
试剂五	100	100	100	100

充分混匀，置于 37℃ 水浴锅/37℃ 恒温培养箱中 10min				
试剂六	480	480	480	480
充分混匀，室温静置 5min，尽快测定 505nm 波长处的吸光值，分别记为 A 测定管、A 对照管、A 标准管、A 空白管，计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管， ΔA 标准=A 标准管-A 空白管。（空白管只需测定 1~2 次）				

六、ICDHm 活性计算

1、标准曲线绘制：

以各个标准溶液的浓度为 x 轴，其对应的 ΔA 标准为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 带入方程得到 $x(\mu\text{mol/mL})$ 。

2、酶活力计算：

酶活定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟产生 1 nmol α -酮戊二酸定义为一个酶活性单位。

$$\text{ICDHm 酶活力 (U/mg prot)} = x \times V_{\text{上清}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{上清}}) \div T \times 10^3 = x \div C_{\text{pr}} \times 16.67$$

V 上清：加入上清液体积，0.2mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL，需自行测定；T：反应时间，1h=60min； 10^3 ：单位换算系数， $1\mu\text{mol} = 10^3\text{nmol}$ 。

七、注意事项：

- 1、为保证实验结果的准确性，需先取 1-2 个样做预实验，如果测定的吸光值过高（高于 1），可用提取液三稀释上清液后再测定。计算结果时注意乘以稀释倍数。
- 2、推荐使用样本蛋白浓度计算酶活，若用样本质量计算，则需加测胞浆提取物酶活，上清和沉淀酶活之和方为总酶活。
- 3、附：使用样本重量计算公式

八、上清（胞浆）中 ICDHm 活力计算：

按样本质量计算

酶活定义：每 g 组织在反应体系中每分钟产生 1 nmol α-酮戊二酸定义为一个酶活性单位。

$$\text{ICDHm 活性 (U/g 质量)} = x \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \div T \times 10^3 = 25.25 \times x \div W$$

V 提取：加入提取液体积，1.515mL；V 样：加入上清液体积，0.2mL；W：样本质量，g；T：反应时间，1h=60min； 10^3 ：单位换算系数， $1 \mu\text{mol} = 10^3 \text{nmol}$ 。

九、沉淀（线粒体）中 ICDHm 活力计算：

按样本质量计算

酶活定义：每 g 组织在反应体系中每分钟产生 1 nmol α-酮戊二酸定义为一个酶活性单位。

$$\text{ICDHm 活性 (U/g 质量)} = x \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \div T \times 10^3 = 10.1 \times x \div W$$

V 提取：沉淀重悬时加入提取液体积，0.606mL；V 样：加入上清液体积，0.2mL；W：样本质量，g；T：反应时间，1h=60min； 10^3 ：单位换算系数， $1 \mu\text{mol} = 10^3 \text{nmol}$ 。

十、样本 ICDHm 总活力计算：

样本 ICDHm 总活力即为上清（胞浆）中 ICDHm 活力与沉淀（线粒体）中 ICDHm 活力之和。

按样本质量计算：ICDHm (U/g 质量) = $25.25 \times x \div W + 10.1 \times x \div W$