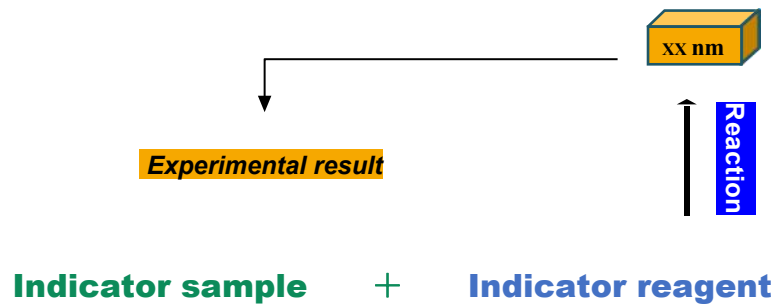


上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

## 胞浆异柠檬酸脱氢酶（ICDHc）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

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  $\alpha$ -酮戊二酸，同时还原 NADP<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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、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。

试剂的组成和配制：

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 50 mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	粉剂×1 支	4℃保存	用时加 550 $\mu$ 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 $\mu$ L 蒸馏水充分溶解备用；现配现用

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。

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 (μL)	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 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 2min 20s 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， $8 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADPH 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，0.03 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。