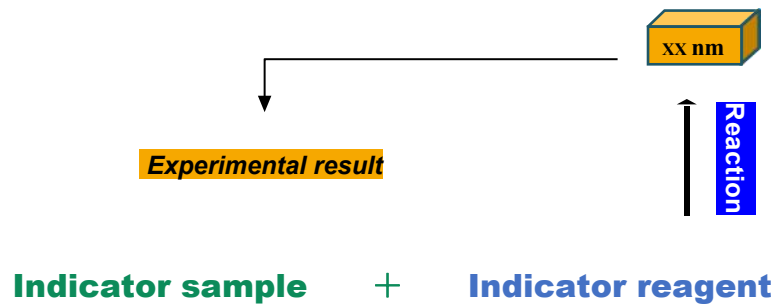


上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

## 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

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

产品组成：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	50mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂二	10mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂三	1mL×1 支	-20℃保存	
试剂四	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂×1 支	4℃保存	
试剂六	粉剂×1 支	-20℃保存	
试剂七	粉剂×1 支	-20℃保存	临用前加入 3mL 蒸馏水充分混匀待用，现配现用
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4℃保存一周；			

### 产品说明：

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。

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

### 需自备的仪器和用品

紫外分光光度计、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。

## 操作步骤:

### 一、 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 10uL 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。
- 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 200uL 试剂二和 2uL 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。

### 二、 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°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 孵育 5min。
- 3、在 1mL 石英比色皿中依次加入 60 μL 试剂七、80 μL 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  $\Delta A = A2 - A1$ 。

### 三、 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。

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

#### (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。ICDHm

$$\text{活性 (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.463$$

$\times \Delta A$  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。