

胞浆异柠檬酸脱氢酶 (ICDHc) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

注 意：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、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：

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；

试剂三：粉剂×1 支，4℃ 保存；

试剂四：粉剂×1 支，-20℃ 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℃ 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、将试剂二转移至试剂一中充分溶解，置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴中预热 10min 左右；用不完的试剂 4℃ 保存。
- 3、在试剂三中加入 550 μ L 蒸馏水充分溶解，置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴中预热 10min 左右；用不完的试剂分装后 -20℃ 保存，禁止反复冻融。
- 4、在试剂四中加入 550 μ L 蒸馏水充分溶解，置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴中预热 10min 左右；用不完的试剂分装后 -20℃ 保存，禁止反复冻融。

5、操作表:

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	750
试剂三	10
试剂四	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 2min20s 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。

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

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟生成 1 nmol 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, 8×10^{-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。