

线粒体异柠檬酸脱氢酶 (ICDHm) 活性检测试剂盒 (可见分光光度法)

产品货号: BA2238

产品规格: 50T/24S

产品简介:

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。

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。



注意: 实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。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。

产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体45mL×1瓶	2-8°C
提取液二	液体600 μ L×2支	-20°C
提取液三	液体40mL×1瓶	2-8°C
试剂一	液体10mL×1瓶	2-8°C
试剂二	液体10mL×1瓶	室温
试剂三	粉剂×2支	-20°C
试剂四	液体10mL×1瓶	室温
试剂五	液体35mL×1瓶	室温
标准品	粉剂×1支	2-8°C

溶液的配制:

- 提取液二: 易挥发试剂, 用完后盖紧盖儿后及时放回-20°C保存;
- 试剂三: 临用前加入0.75mL蒸馏水, 充分溶解待用, 用不完的试剂-20°C分装保存4周, 避免反复冻融;
- 标准品: 10mg α -酮戊二酸。临用前加入684 μ L蒸馏水, 配成100 μ mol/mL标准液, 2-8°C保存8周;
- 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。

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。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

- 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。
- 4°C, 1000g 离心 10min。将上清液移至另一离心管中, 4°C, 11000g 离心 15min。
- 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)。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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 300w，超声 5 秒，间隔 9 秒，4min），4 $^{\circ}$ C，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。

二、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. 标准品稀释表：

序号	稀释前浓度 (μ mol/mL)	标准液体积 (μ L)	提取液三体积 (μ L)	稀释后浓度 (μ mol/mL)
1	100	60	940	6
2	6	100	900	0.6
3	0.6	500	500	0.3
4	0.3	500	500	0.15
5	0.15	500	500	0.075
6	0.075	500	500	0.0375
7	0.0375	500	500	0.01875

备注：下述实验中每个标准管需 200 μ L 标准溶液(注意不要在此步骤直接检测吸光值)。

4. 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
试剂三	-	20	20	20
蒸馏水	20	-	-	200
充分混匀，置于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅/37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中反应 1h				
试剂四	100	100	100	100
充分混匀，置于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅/37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中 10min				
试剂五	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）				

三、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(μ 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 1nmol α -酮戊二酸定义为一个酶活性单位。

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

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 μ mol = 10^3 nmol。

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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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

A、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 1nmol 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， $1\mu\text{mol} = 10^3\text{nmol}$ 。

B、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 1nmol 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， $1\mu\text{mol} = 10^3\text{nmol}$ 。

C、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。

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

实验实例：

- 取 0.3g 小鼠肾脏加入 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。4 $^{\circ}$ C, 1000g 离心 10min。将上清液移至另一离心管中，4 $^{\circ}$ C, 11000g 离心 15min。上清液即胞浆提取物，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，4 $^{\circ}$ C, 10000g 离心 10min，取上清液，分别按操作步骤检测，测得：胞浆 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管=0，线粒体 A 测定=A 测定管-A 对照管=0.767-0.475=0.292，带入标准曲线 $y=1.0917x+0.0471$ 计算相应的 x 值，按样本质量计算酶活得：
胞浆中 ICDHm 活性(U/g 质量)= $25.25 \times x \div W=0$ U/g 质量
线粒体中 ICDHm 活性(U/g 质量)= $10.1 \times x \div W=7.55$ U/g 质量
样本总 ICDHm(U/g 质量)= $25.25 \times x \div W + 10.1 \times x \div W=7.55$ U/g 质量。
- 取 0.3g 小化眉加入 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。4 $^{\circ}$ C, 1000g 离心 10min。将上清液移至另一离心管中，4 $^{\circ}$ C, 11000g 离心 15min。上清液即胞浆提取物，上清液稀释 2 倍，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，4 $^{\circ}$ C, 10000g 离心 10min，取上清液稀释 2 倍，分别按操作步骤检测，测得：胞浆 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管=0，线粒体 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管=0.635-0.487=0.148，带入标准曲线 $y=1.0917x+0.047$ 计算相应 x 值，按样本质量计算酶活得：
胞浆中 ICDHm 活性(U/g 质量)= $25.25 \times x \div W \times 2=15.49$ U/g 质量
线粒体中 ICDHm 活性(U/g 质量)= $10.1 \times x \div W \times 2=2.28$ U/g 质量
样本总 ICDHm(U/g 质量)= $25.25 \times x \div W \times 2 + 10.1 \times x \div W \times 2=15.49$ U/g 质量。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com