

## 胞浆异柠檬酸脱氢酶 (ICDHc) 活性检测试剂盒 (微量法)

产品货号: BA1050

产品规格: 100管/96样

### 产品说明:

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+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。

利用ICDHc催化NADP+还原成NADPH反应, 在340nm下测定NADPH浓度的增加, 即可反映ICDHc活性。

**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。**

### 产品内容:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体120mL×1瓶	4℃
试剂一	粉剂×1瓶	4℃
试剂二	粉剂×1支	4℃
试剂三	粉剂×1支	4℃

### 溶液的配制:

1. 试剂一: 用时加入20mL提取液溶解;
2. 试剂二: 用时每支加275  $\mu$ L双蒸水充分溶解备用;
3. 试剂三: 用时每支加275  $\mu$ L双蒸水充分溶解备用;
4. 工作液配制: 将试剂一、试剂二、试剂三按85: 1: 1的比例混合, 现用现配。

### 所需的仪器和用品:

紫外分光光度计/酶标仪、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板 (UV板)、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

### 测定步骤:

#### 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)

##### 1. 细菌、细胞或组织样本的制备:

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; 按照每200万细菌或细胞加入400 $\mu$ L提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (功率20%, 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: 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) 样本: 直接检测。

#### 二、测定步骤

1. 分光光度计或酶标仪预热30min以上, 调节波长至340nm, 蒸馏水调零。
2. 按下表步骤加样:



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

试剂名称 (μL)	测定管
工作液	190
样本	10

将上述试剂按顺序加入微量石英比色皿/石英96孔板中，加样本的同时开始计时，在340nm波长下记录20秒时的初始吸光度A1；迅速将比色皿连同反应液一起放入37℃水浴中，准确反应2分钟（酶标仪有控温功能，可以将温度调至37℃）；迅速取出比色皿并擦干，记录2分20秒时的吸光度A2。计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。）

### 三、ICDHc活力单位的计算

#### a、按微量石英比色皿计算：

##### 1. 血清（浆）ICDHc活力的计算

单位的定义：每mL血清（浆）在反应体系中每分钟生成1nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样本}} \div T = 1608 \times \Delta A$$

##### 2. 组织中ICDHc活力的计算

（1）按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每mg组织蛋白在反应体系中每分钟生成1nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样本}} \times \text{Cpr}) \div T = 1608 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

（2）按样本质量计算：

单位的定义：每g组织在反应体系中每分钟生成1nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (U/g质量)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div W$$

##### 3. 细菌或培养细胞中ICDHc活力的计算

（1）按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每mg组织蛋白在反应体系中每分钟生成1nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样本}} \times \text{Cpr}) \div T = 1608 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

（2）按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每1万个细菌或细胞在反应体系中每分钟生成1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (U/10}^4 \text{ Cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样本}} \times 500) \div T = 3.2 \times \Delta A$$

V反总：反应总体积， $2 \times 10^{-4}$ L； $\epsilon$ ：NADPH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$ L/mol/cm；d：石英比色皿光径，1cm；V样本：加入样本体积，0.01mL；V提取：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：反应时间，2min；500：细菌或细胞密度，500万/mL。

#### b、按96孔板（UV板）计算：

将上述公式中光径d-1cm改为d-0.6cm（96孔板光径）进行计算即可。

#### 注意事项：

1. 若 $A_2 - A_1$ 大于0.5，需将酶液用提取液稀释，使 $A_2 - A_1$ 小于0.5，可提高检测灵敏度。若初始值 $A_1$ 大于0.5可尝试将酶液用提取液稀释。
2. 实验时，试剂二、试剂三和样本在冰上放置，以免变性和失活；工作液37℃水浴放置。
3. 比色皿中反应液的温度必须保持37℃，取小烧杯一只装入一定量的37℃蒸馏水，将此烧杯放入37℃水浴锅中。在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中。
4. 最好两个人同时做此实验，一个人比色，一个人计时，以保证实验结果的准确性。



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