

线粒体异柠檬酸脱氢酶 (ICDHm) 活性检测试剂盒 (紫外分光光度法)

产品货号: BA1405

产品规格: 50管/48样

产品简介:

ICDHm (EC1.1.1.41)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 α -酮戊二酸,同时将 NAD^+ 还原为 NADH ,是三羧酸循环的限速酶之一,其催化的反应是细胞 NADH 主要来源之一。

ICDHm催化 NAD^+ 还原生成 NADH ,导致340nm处光吸收上升。

产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	50mL×1瓶	-20°C
试剂二	10mL×1瓶	-20°C
试剂三	1mL×1支	-20°C
试剂四	液体60mL×1瓶	4°C
试剂五	粉剂×1支	4°C
试剂六	粉剂×1支	-20°C
试剂七	粉剂×1支	-20°C

溶液的配制:

1. 试剂七: 临用前加入3mL蒸馏水充分混匀待用, 现配现用。
2. 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°C保存一周。

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、1mL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10 μ L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200 μ L试剂二和2 μ L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 μ L试剂七、80 μ L样本和1mL工作液, 混匀, 立即记录340nm处20s时的吸光值 A_1 和2min20s时的吸光值 A_2 , 计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。



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

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1nmol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1nmol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1nmol的NADH定义为一个酶活性单位。

$$\text{ICDHm活性(nmol/min/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.463 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， 1.14×10^{-3} L； ϵ ：NADH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，0.08mL；V样总：加入提取液体积，0.202mL；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。



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>