

胞浆异柠檬酸脱氢酶 (ICDHc) 活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

货号: BC0400

规格: 50T/48S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 100 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 支	2-8℃保存
试剂三	粉剂×2 支	2-8℃保存

溶液的配制:

1. 试剂一: 用时加入 50 mL 提取液溶解;
2. 试剂二: 用时每支加 275 μ L 蒸馏水充分溶解备用;
3. 试剂三: 用时每支加 275 μ L 蒸馏水充分溶解备用;
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。

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 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。

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。

需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、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)

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 μ L 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (功率 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: 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. 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
2. 按下表步骤加样:





试剂名称 (μL)	测定管
工作液 (μL)	950
样本 (μL)	50

将上述试剂按顺序加入 1mL 石英比色皿中，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 1mL 石英比色皿连同反应液一起放入 37°C 水浴中，准确反应 2 分钟；迅速取出 1mL 石英比色皿并擦干，记录 2 分 20 秒时的吸光度 A2。计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

三、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）在反应体系中每分钟生成 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

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。

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

(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。

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

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。

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

(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。

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

V 反总：反应总体积，0.001L； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；d：1mL 石英比色皿光径，1cm；
V 样本：加入样本体积，0.05mL；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。

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。若初始值 A1 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°C 水浴放置。
- 3、1mL 石英比色皿中反应液的温度必须保持 37°C，取小烧杯一只装入一定量的 37°C 蒸馏水，将此烧杯放入 37°C 水浴锅中。在反应过程中把 1mL 石英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。

实验实例：

1. 取 0.1g 稗草，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，然后 8000g 4°C 离心 10min，取上清，之后按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A = A2 - A1 = 0.240 - 0.224 = 0.016$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{ICDHc 活性 (U/g 质量)} = 1608 \times \Delta A \div W = 257.28 \text{ U/g 质量}。$$



2. 取 0.1g 小鼠肺部组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 然后 8000g 4℃离心 10min, 取上清稀释 5 倍, 之后按照测定步骤操作, 测得计算 $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.253 - 0.141 = 0.112$, 按样本质量计算酶活得:
ICDHc 活性 (U/g 质量) = $1608 \times \Delta A \div W \times 5 = 9004.8$ U/g 质量。
3. 取小鼠血清样本直接检测, 测得计算 $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.225 - 0.2 = 0.025$, 按血清计算得:
ICDHc 活性 (U/mL) = $1608 \times \Delta A = 40.2$ U/mL。

相关发表文献:

- [1] Jiang Y, Cao S, Zhou B, Cao Q, Xu M, Sun T, Zhao X, Zhou Z, Wang Y. Hemocytes in blue mussel *Mytilus edulis* adopt different energy supply modes to cope with different BDE-47 exposures. *Sci Total Environ.* 2023 Aug 10;885:163766. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.163766. Epub 2023 May 3. PMID: 37146804.
- [2] Yuan Z, Wang J, Che R, God'spower BO, Zhou Y, Dong C, Li L, Chen M, Eliphaz N, Liu X, Li Y. Relationship between L-lactate dehydrogenase and multidrug resistance in *Staphylococcus xylosus*. *Arch Microbiol.* 2021 Dec 28;204(1):91. doi: 10.1007/s00203-021-02625-8. PMID: 34962581.
- [3] Zhou Y, Liu X, Huang C, Lin D. Lactate Activates AMPK Remodeling of the Cellular Metabolic Profile and Promotes the Proliferation and Differentiation of C2C12 Myoblasts. *Int J Mol Sci.* 2022 Nov 13;23(22):13996. doi: 10.3390/ijms232213996. PMID: 36430479; PMCID: PMC9694550.
- [4] Zhang X, Wei X, Ali MM, Rizwan HM, Li B, Li H, Jia K, Yang X, Ma S, Li S, Chen F. Changes in the Content of Organic Acids and Expression Analysis of Citric Acid Accumulation-Related Genes during Fruit Development of Yellow (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) and Purple (*Passiflora edulis* f. *edulis*) Passion Fruits. *Int J Mol Sci.* 2021 May 28;22(11):5765. doi: 10.3390/ijms22115765. PMID: 34071242; PMCID: PMC8198880.
- [5] Zhan S, Zhang Q, Yao Y, Cui Y, Huang T. Cytosolic isocitrate dehydrogenase regulates plant stem cell maintenance in response to nutrient deficiency. *Plant Physiol.* 2023 Aug 3;192(4):3069-3087. doi: 10.1093/plphys/kiad246. PMID: 37086475.

参考文献:

- [1] Miake F, TORIKATA T, KOGA K, et al. Isolation and characterization of NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase from the pupa of *Bombyx mori* [J]. *The Journal of Biochemistry*, 1977, 82(2): 449-454.
- [2] Yang JH, Yang ES, Park JW. Inactivation of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase by lipid peroxidation products [J]. *Free Radical Research*, 2004, 38(3): 241-249.
- [3] Kil IS, Lee YS, Bae YS. et al. Modulation of NADP (+)-dependent isocitrate dehydrogenase in aging [J]. *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, 2004, 9(5): 271-277.
- [4] Popova T, Pinheiro MA, Matasova L. et al. Regulation of mitochondrial NADP-isocitrate dehydrogenase in rat heart during ischemia [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2007, 294(1-2): 97-105.

相关系列产品:

- BC1110/BC1115 NADP 磷酸酶 (NADPase) 活性检测试剂盒
- BC0260/BC0265 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (G6PDH) 活性检测试剂盒
- BC1120/BC1125 NADP 苹果酸酶 (NADP-ME) 活性检测试剂盒
- BC1130/BC1135 NAD-苹果酸酶 (NAD-ME) 活性检测试剂盒
- BC2100/BC2105 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (6PGDH) 活性检测试剂盒

