

胞浆异柠檬酸脱氢酶 (ICDHc) 活性检测试剂盒说明书

微量法

货号: BC0405

规格: 100T/96S

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 120 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	2-8℃保存
试剂三	粉剂×1 支	2-8℃保存

溶液的配制:

1. 试剂一: 用时加入 20 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/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 UV 板、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、分光光度计/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:





试剂名称 (μL)	测定管
工作液 (μL)	190
样本 (μL)	10

将上述试剂按顺序加入微量石英比色皿/96孔UV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；迅速将微量石英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℃）；迅速取出微量石英比色皿并擦干，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。

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

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。

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

(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。

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

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。

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

(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。

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

V_{反应}：反应总体积，2×10⁻⁴L；ε：NADPH摩尔消光系数，6.22×10³L/mol/cm；d：微量石英比色皿光径，1cm；V_{样本}：加入样本体积，0.01mL；V_{提取}：加入提取液体积，1mL；C_{pr}：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UV板光径）进行计算即可。

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℃水浴放置。
3. 微量石英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。



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℃离心 10min, 取上清, 之后按照测定步骤操作, 用微量石英比色皿测得计算 $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.2285 - 0.2139 = 0.0146$, 按样本质量计算酶活得:
ICDHc 活性 (U/g 质量) = $1608 \times \Delta A \div W = 234.768$ U/g 质量。
2. 取 0.1g 小鼠肾组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 然后 8000g 4℃离心 10min, 取上清稀释 10 倍, 之后按照测定步骤操作, 用微量石英比色皿测得计算 $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.5989 - 0.1263 = 0.4726$, 按样本质量计算酶活得:
ICDHc 活性 (U/g 质量) = $1608 \times \Delta A \div W \times 10 = 75994.08$ U/g 质量。

相关发表文献:

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Xu R, Xu P, Wei H, Huang Y, Zhu X, Lin C, Yan Z, Xin L, Li L, Lv W, Zeng S, Tian G, Ma J, Cheng B, Lu H, Chen Y. Ticlopidine induces embryonic development toxicity and hepatotoxicity in zebrafish by upregulating the oxidative stress signaling pathway. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2023 Jul 31; 262:115283. doi: 10.1016/j.ecoenv.2023.115283. Epub ahead of print. PMID: 37531924.

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

