

线粒体异柠檬酸脱氢酶 (ICDHm) 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: BC2160

规格: 50T/24S

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
提取液一	液体 45 mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液二	液体 600 μL×2 支	-20℃保存
提取液三	液体 40mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 10mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 10mL×1 瓶	常温保存
试剂三	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂四	液体 10 mL×1 瓶	常温保存
试剂五	液体 35 mL×1 瓶	常温保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

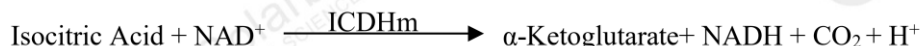
溶液的配制:

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

产品说明:

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。

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)

1. 称取约 0.3g 组织或收集 1500 万细胞, 加入 1.5mL 提取液一和 15μL 提取液二, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
2. 4℃, 1000g 离心 10min。将上清液移至另一离心管中, 4℃, 11000g 离心 15min。





3. 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）。

4. 在沉淀中加入 600μL 提取液三和 6μL 提取液二，超声波破碎（功率 300w，超声 5 秒，间隔 9 秒，4min），4℃，10000g 离心 10 min，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 μmol/mL标准溶液。

3、标准品稀释表：

序号	稀释前浓度 (μmol/mL)	标准液体积 (μL)	提取液三体积 (μL)	稀释后浓度 (μmol/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200μL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 (μL)	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℃水浴锅/37℃恒温培养箱中反应1h				
试剂四	100	100	100	100
充分混匀，置于37℃水浴锅/37℃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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。（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(μmol/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1 nmol α-酮戊二酸定义为一个酶活性单位。

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

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，1μmol=10³nmol。



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。
- 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1 nmol α -酮戊二酸定义为一个酶活性单位。

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1 nmol α -酮戊二酸定义为一个酶活性单位。

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。

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

实验实例:

- 1、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℃, 1000g 离心 10min。将上清液移至另一离心管中, 4℃, 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℃, 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 ΔA 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。
- 2、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℃, 1000g 离心 10min。将上清液移至另一离心管中, 4℃, 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℃, 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 $y=1.0917x+0.0471$ 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) = $25.25 \times x \div W \times 2 = 15.49$ 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。





相关发表文献:

[1] 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.

[2] Chong D, Gu Y, Zhang T, Xu Y, Bu D, Chen Z, Xu N, Li L, Zhu X, Wang H, Li Y, Zheng F, Wang D, Li P, Xu L, Hu Z, Li C. Neonatal ketone body elevation regulates postnatal heart development by promoting cardiomyocyte mitochondrial maturation and metabolic reprogramming. *Cell Discov.* 2022 Oct 11;8(1):106. doi: 10.1038/s41421-022-00447-6. PMID: 36220812; PMCID: PMC9553951.

[3] 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.

参考文献:

Igamberdiev A U, Gardeström P. Regulation of NAD- and NADP-dependent isocitrate dehydrogenases by reduction levels of pyridine nucleotides in mitochondria and cytosol of pea leaves[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2003, 1606(1-3): 117-125.

相关系列产品:

BC0710/BC0715 α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 活性检测试剂盒

BC0950/BC0955 琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活性检测试剂盒

BC0380/BC0385 丙酮酸脱氢酶 (PDH) 活性检测试剂盒

