

线粒体异柠檬酸脱氢酶 (ICDHm) 活性检测试剂盒说明书

微量法

货号: BC2165

规格: 100T/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
提取液一	液体 60 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 40 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 5mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 5mL×1 瓶	常温保存
试剂三	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂四	液体 5 mL×1 瓶	常温保存
试剂五	液体 15 mL×1 瓶	常温保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

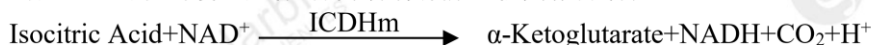
溶液的配制:

- 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 0.375 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/酶标仪、水浴锅/恒温培养箱、微量玻璃比色皿/96孔板、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 0.2 g 组织或收集 1000 万细胞, 加入 1mL 提取液一和 10μL 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 400 μ L 提取液三和 4 μ L 提取液二，超声波破碎（功率 300w，超声 5 秒，间隔 9 秒，4min），4 $^{\circ}$ C，10000g 离心 10min，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/酶标仪预热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 μ mol/mL标准溶液。
- 3、标准溶液稀释表

序号	稀释前浓度 (μ mol/mL)	标准液体积 (μ L)	提取液三体积 (μ L)	稀释后浓度 (μ mol/mL)
1	100	60	940	6
2	6	50	450	0.6
3	0.6	200	200	0.3
4	0.3	200	200	0.15
5	0.15	200	200	0.075
6	0.075	200	200	0.0375
7	0.0375	200	200	0.01875

备注：下述实验中每个标准管需40 μ L标准溶液（注意不要在此步骤直接检测吸光值）。

- 4、操作表（在0.6 mL EP管/96孔板中进行如下操作）：

试剂名称 (μ L)	对照管	测定管	标准管	空白管
上清液	40	40	-	-
标准溶液	-	-	40	-
工作液	40	40	40	40
试剂三	-	4	4	4
蒸馏水	4	-	-	40
充分混匀，置于37 $^{\circ}$ C水浴锅/37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中反应1 h				
试剂四	20	20	20	20
充分混匀，置于37 $^{\circ}$ C水浴锅/37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中10 min				
试剂五	96	96	96	96
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 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管， ΔA 标准=A 标准管-A 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(μ mol/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1nmol α -酮戊二酸定义为一个酶活性单位。

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

V上清：加入上清液体积，0.04mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL，需自行测定；V反总：反应体系总体积，0.2mL；T：反应时间，1h=60min； 10^3 ：单位换算系数， $1\mu\text{mol}=10^3\text{nmol}$ 。



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:

酶活定义:每g组织在反应体系中每分钟产生1nmol α-酮戊二酸定义为一个酶活性单位。

$$\text{ICDHm活性 (U/g 质量)} = x \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \div T \times 10^3 = 16.83 \times x \div W$$

V提取:加入提取液体积,1.01mL; V样:加入上清液体积,0.04mL; W:样本质量, g; T:反应时间, 1h=60min;

10³:单位换算系数, 1μmol = 10³nmol。

B、沉淀(线粒体)中ICDHm活力计算:

酶活定义:每g组织在反应体系中每分钟产生1nmol α-酮戊二酸定义为一个酶活性单位。

$$\text{ICDHm活性 (U/g 质量)} = x \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \div T \times 10^3 = 6.73 \times x \div W$$

V提取:沉淀重悬时加入提取液体积,0.404mL; V样:加入上清液体积,0.04mL; W:样本质量, g; T:反应时间, 1h=60min; 10³:单位换算系数, 1μmol = 10³nmol。

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。

$$\text{按样本质量计算: ICDHm (U/g 质量)} = 16.83 \times x \div W + 6.73 \times x \div W$$

实验实例:

- 1、取0.2g小鼠肾脏加入1.5mL提取液一和15μL提取液二,用冰浴匀浆器匀浆。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600μL提取液三和6μL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,用96孔板测得:胞浆ΔA测定=A测定管-A对照管=0.25-0.25=0,线粒体ΔA测定=A测定管-A对照管=0.433-0.279=0.154,带入标准曲线 $y=0.5533x+0.0319$ 计算x值,按样本质量计算酶活得:
胞浆中ICDHm活性(U/g质量)= $16.83 \times x \div W = 0$ U/g质量
线粒体中ICDHm活性(U/g质量)= $6.73 \times x \div W = 7.43$ U/g质量
样本总ICDHm(U/g质量)= $16.83 \times x \div W + 6.73 \times x \div W = 7.43$ U/g质量。
- 2、取0.3g黑麦草加入1.5mL提取液一和15μL提取液二,用冰浴匀浆器匀浆。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600μL提取液三和6μL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,用96孔板测得:胞浆ΔA测定=A测定管-A对照管=0.377-0.34=0.037,线粒体ΔA测定=A测定管-A对照管=0.711-0.649=0.062,带入标准曲线 $y=0.5533x+0.0319$ 计算x值,按样本质量计算酶活得:
胞浆中ICDHm活性(U/g质量)= $16.83 \times x \div W \times 2 = 1.55$ U/g质量
线粒体中ICDHm活性(U/g质量)= $6.73 \times x \div W \times 2 = 3.66$ U/g质量
样本总ICDHm(U/g质量)= $16.83 \times x \div W \times 2 + 6.73 \times x \div W \times 2 = 5.21$ U/g质量。

相关发表文献:

- [1] Zhuang D, Li R, Wang S, Ahmad HN, Zhu J. Reinforcing effect of 蔚-polylysine-carboxymethyl chitosan





nanoparticles on gelatin-based film: Enhancement of physicochemical, antioxidant, and antibacterial properties. *Int J Biol Macromol.* 2024 Jan;255:128043. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.128043. Epub 2023 Nov 18. PMID: 37984581.

[2] Lin S, Yin S, Shi J, Yang G, Wen X, Zhang W, Zhou M, Jiang X. Orchestration of energy metabolism and osteogenesis by Mg²⁺ facilitates low-dose BMP-2-driven regeneration. *Bioact Mater.* 2022 Mar 24;18:116-127. doi: 10.1016/j.bioactmat.2022.03.024. PMID: 35387176; PMCID: PMC8961427.

[3] Wang Y, Li X, Chen Q, Jiao F, Shi C, Pei M, Wang L, Gong Z. Histone Deacetylase 6 Regulates the Activation of M1 Macrophages by the Glycolytic Pathway During Acute Liver Failure. *J Inflamm Res.* 2021 Apr 15;14:1473-1485. doi: 10.2147/JIR.S302391. PMID: 33883923; PMCID: PMC8055295.

[4] Chen L, Tian Q, Shi Z, Qiu Y, Lu Q, Liu C. Melatonin Alleviates Cardiac Function in Sepsis-Caused Myocarditis via Maintenance of Mitochondrial Function. *Front Nutr.* 2021 Oct 11;8:754235. doi: 10.3389/fnut.2021.754235. PMID: 34708067; PMCID: PMC8542660.

参考文献:

[1] 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

