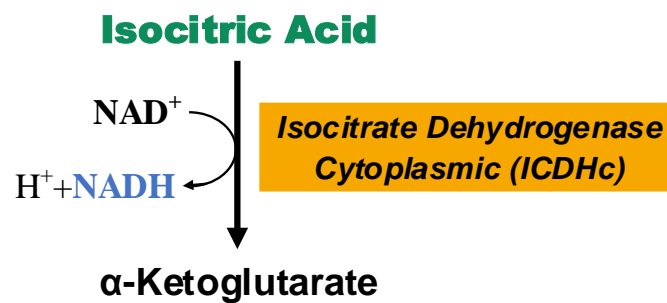




胞浆异柠檬酸脱氢酶 (ICDHc) 活性检测试剂盒

Isocitrate Dehydrogenase Cytoplasmic (ICDHc) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



胞浆异柠檬酸脱氢酶 (ICDHc) 活性检测试剂盒

Isocitrate Dehydrogenase Cytoplasmic (ICDHc) Activity Assay Kit

一、产品描述

异柠檬酸脱氢酶 (Isocitrate dehydrogenase, IDH) 作为三羧酸循环中的关键酶参与细胞能量代谢, 能够催化异柠檬酸氧化脱羧生成 α -酮戊二酸 (α -Ketoglutarate, α -KG), 并将氧化型 NAD 还原为 NADH。胞浆异柠檬酸脱氢酶 (ICDHc) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 是细胞质中除了磷酸戊糖途径外又一种 NADPH 重要来源, 对生物体能量代谢、生物合成及抗氧化胁迫具有重要作用。

ICDHc 催化异柠檬酸生成 α -酮戊二酸, 并将 NAD^+ 还原为 NADH, NADH 在 340 nm 处具有特征吸收峰, 通过吸光度的变化即可表征 ICDHc 的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
提取液	液体 120 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	粉剂×1 瓶	4°C 保存	使用时加入 20 mL 提取液充分溶解
试剂二	粉剂×1 支	4°C 保存	使用时加入 275 μL 蒸馏水充分溶解 (配制后可-20°C分装保存, 严禁反复冻融)
试剂三	粉剂×1 支	-20°C 保存	使用时加入 275 μL 蒸馏水充分溶解 (配制后可-20°C分装保存, 严禁反复冻融)
ICDHc 工作液的配制 (现用现配): 根据使用量按试剂一: 试剂二: 试剂三 = 85:1:1 的体积比配制, 充分混匀即为 ICDHc 工作液。			

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿 (光径 10 mm) /96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1. 粗酶液的制备 (可根据预实验结果适当调整样本量及比例)

① 细菌或细胞: 离心收集细菌或细胞至离心管内, 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 (500-1000): 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液) 处理样品, 冰浴超声破碎 (功率 20% 或 200 W, 超声 3 s, 间隔 10 s, 重复 30 次), 4°C 8000 g 离心 10 min, 取上清置于冰上待测。

②组织：按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1：(5-10) 的比例（建议称取约 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4°C 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

③血清（浆）、培养液等液体样本：直接检测或适当稀释后再进行检测。

2.测定步骤

①紫外分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm，蒸馏水调零。

②在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定管 (μL)
粗酶液	10
ICDHc 工作液	190

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 20 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A1；

②37°C 准确反应 120 s，测定 140 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A2；③计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

3.胞浆异柠檬酸脱氢酶 (ICDHc) 活性计算

3.1 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{3215.43 \times \Delta A}{C_{\text{pr}}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \times V_{\text{提}}}{\epsilon \times d_1 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{3215.43 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \times V_{\text{提}}}{\epsilon \times d_1 \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{3215.43 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times T} = 3215.43 \times \Delta A$$

3.2 使用微量石英比色皿测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times \text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{1607.72 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \times V_{\text{提}}}{\epsilon \times d_2 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{1607.72 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \times V_{\text{提}}}{\epsilon \times d_2 \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{1607.72 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times T} = 1607.72 \times \Delta A$$

注释： V 提：粗酶液总体积，1 mL；V 样：体系中加入粗酶液的体积，0.01 mL；V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm； d_1 ：96 孔 UV 板光径，0.5 cm； d_2 ：微量石英比色皿光径，1 cm；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计；T：反应时间，2 min。

四、注意事项

- ①测定过程中试剂二、试剂三和样本需冰上放置，以免失活，工作液 37°C 水浴中放置；
- ②准确在 20 s 和 140 s 处完成吸光值测定，以保证实验结果的准确性和重复性；若使用 96 孔 UV 板应使用多道移液器且分批进行测定，以确保组间反应时间一致；
- ③若 ΔA 和 A_{11} > 0.5 建议将粗酶液使用提取液适当稀释后再进行测定，使 ΔA 和 A_{11} < 0.5 以提高检测的灵敏度；
- ④为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

