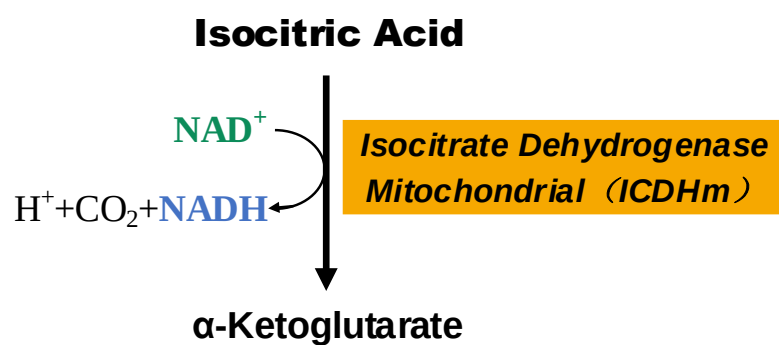




线粒体异柠檬酸脱氢酶 (ICDHm) 活性检测试剂盒

Isocitrate Dehydrogenase Mitochondrial (ICDHm) Activity Assay Kit



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



线粒体异柠檬酸脱氢酶 (ICDHm) 活性检测试剂盒

Isocitrate Dehydrogenase Mitochondrial (ICDHm) 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 NAD 还原为 NADH。线粒体异柠檬酸脱氢酶 (ICDHm) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞的线粒体中, 对生物体能量代谢、生物合成及抗氧化胁迫具有重要作用。

ICDHm 催化异柠檬酸生成 α -酮戊二酸, 并将 NAD^+ 还原为 NADH, α -酮戊二酸在 505 nm 处具有特征吸收峰, 通过吸光度的变化即可表征 ICDHm 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 A	液体 45 mL×1 瓶	4°C 保存	-
提取液 B	液体 600 μL ×2 支	-20°C 保存	含有易挥发组分 (使用后密封且及时放入 -20°C 保存)
提取液 C	液体 40 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	液体 10 mL×1 瓶	RT	-
试剂三	粉剂×2 支	-20°C 保存	使用前加入 750 μL 蒸馏水充分溶解 (分装后 -20°C 可保存 1 个月, 避免反复冻融)
试剂四	液体 10 mL×1 瓶	RT	-
试剂五	液体 35 mL×1 瓶	RT	-
标准品	粉剂×1 支 (10 mg α -酮戊二酸)	4°C 保存	使用前加入 684 μL 蒸馏水充分溶解 (即为 100 $\mu\text{mol/mL}$ α -酮戊二酸标准液)
工作液的制备 (现用现配): 使用前按照使用量将试剂一和试剂二按 1:1 的体积比配制。			

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿 (光径 10 mm)、研钵/匀浆器、可调式移液器、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称取 300 mg 组织或收集 1500 万细胞，加入 1.5 mL 提取液 A 和 15 μ L 提取液 B，使用匀浆器或研钵冰浴研磨至匀浆，4°C 1000 g 离心 10 min，取上清；

②步骤①离心后上清液转移至另一离心管中，4°C 11000 g 离心 15 min；

③步骤②离心后上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的 ICDHm（此步可选做）；

④步骤②离心后沉淀中加入 600 μ L 提取液 C 和 6 μ L 提取液 B，冰浴超声破碎（功率 300 W，超声 5 s，间隔 9 s，总时间 4 min），4°C 11000 g 离心 10 min，上清液即为粗酶液，可用于线粒体 ICDHm 活性测定和蛋白含量的测定。

2.测定步骤

①分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 505 nm，蒸馏水调零。

②标准稀释液的制备：将 100 μ mol/mL α -酮戊二酸标准液使用提取液 C 稀释至 0.6、0.3、0.15、0.075、0.0375、0.01875 μ mol/mL 即为标准稀释液。

③在离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定管 (μ L)	对照管 (μ L)	标准管 (μ L)	空白管 (μ L)
粗酶液	200	200	-	-
标准稀释液	-	-	200	-
工作液	200	200	200	200
试剂三	20	-	20	20
蒸馏水	-	20	-	200
充分混匀，37°C 准确反应 1 h				
试剂四	100	100	100	100
充分混匀，37°C 反应 10 min				
试剂五	480	480	480	480
充分混匀，室温静置 5 min				

吸光值测定：测定 505 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准和 A 空白；计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 对照， ΔA 标准 = A 标准 - A 空白。注：空白管只需测定 1-2 次，每个样品均需设一个对照管。

标准曲线的建立：以 0.6、0.3、0.15、0.075、0.0375、0.01875 μ mol/mL 为横坐标 (x)，对应的 ΔA 标准为纵坐标 (y)，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 测定带入公式中得到 x (μ mol/mL)。

3. 线粒体异柠檬酸脱氢酶 (ICDHm) 活性计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol α-酮戊二酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHm (U/mg prot)} = \frac{x \times V_{\text{样}} \times 10^3}{\text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{16.67 \times x}{\text{Cpr}}$$

注释： V 样：反应体系中加入待测样本的体积，0.2 mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；T：反应时间，1 h = 60 min；10³：单位换算系数 1 μmol = 10³ nmol。

四、注意事项

- ①若测定吸光值大于 1.0, 建议将粗酶液使用提取液 C 适当稀释后再进行测定, 计算时相应修改;
- ②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;
- ③建议使用蛋白浓度计算酶活, 若使用样本质量计算则需加测胞浆提取物酶活, 上清 (胞浆提取物) 和沉淀 (线粒体) 酶活之和即为总酶活。

附：使用样本质量计算的公式

①胞浆提取物 ICDHm 活性计算

单位定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol α-酮戊二酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHm (U/g)} = \frac{x \times V_{\text{样}} \times V_{\text{提}} \times 10^3}{W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{25.25 \times x}{W}$$

注释： V 样：反应体系中加入待测样本的体积，0.2 mL；V 提：加入提取液的体积，1.515 mL；W：样本质量，g；T：反应时间，1 h = 60 min；10³：单位换算系数 1 μmol = 10³ nmol。

②线粒体 ICDHm 活性计算

单位定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol α-酮戊二酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHm (U/g)} = \frac{x \times V_{\text{样}} \times V_{\text{提}} \times 10^3}{W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{10.1 \times x}{W}$$

注释： V 样：反应体系中加入待测样本的体积，0.2 mL；V 提：1-④中沉淀重悬时加入提取液的体积，0.606 mL；W：样本质量，g；T：反应时间，1 h = 60 min；10³：单位换算系数 1 μmol = 10³ nmol。

③ ICDHm 总活性计算

$$\begin{aligned} \text{ICDHm 总活性} &= \text{胞浆提取物 ICDHm 活性} + \text{线粒体 ICDHm 活性} \\ &= \frac{25.25 \times x}{W} + \frac{10.1 \times x}{W} \end{aligned}$$

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

