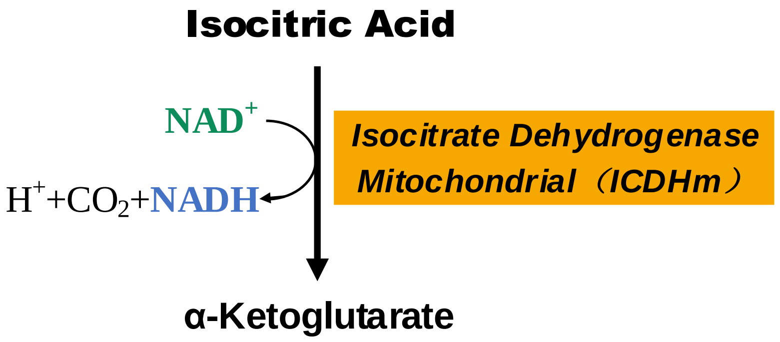
线粒体异柠檬酸脱氢酶（ICDHm）活性检测试剂盒

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60 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5 mL×1瓶	4°C保存	-
试剂二	液体5 mL×1瓶	RT	-
试剂三	粉剂×2支	-20°C保存	**使用前加入375 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5 mL×1瓶	RT	-
试剂五	液体15 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 μmol/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/酶标仪、微量玻璃比色皿（光径10 mm）/96孔板、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。

Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

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 200 mg 组织或收集 1000 万细胞，加入 **1 mL 提取液 A** 和 **10 µL 提取液 B**，使用匀浆器或研钵冰浴研磨至匀浆，4℃ 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℃ 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 **400 µL 提取液 C** 和 **4 µL 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℃ 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分光光度计或酶标仪预热 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 µmol/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 µmol/mL 即为标准稀释液。

③在 96 孔板或离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定组（µL）	对照组（µL）	标准组（µL）	空白组（µL）
粗酶液	40	40	-	-
标准稀释液	-	-	40	-
工作液	40	40	40	40
试剂三	4	-	4	4
蒸馏水	-	4	-	40
充分混匀，37℃准确反应 1 h				
试剂四	20	20	20	20
充分混匀，37℃反应 10 min				
试剂五	96	96	96	96
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：空白组只需测定 1-2 次，每个样品均需设一个对照组。

标准曲线的建立：以 0.6、0.3、0.15、0.075、0.0375、0.01875 µmol/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（µmol/mL）。

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Not for further distribution without written consent.　Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

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。

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

注释：V 样：反应体系中加入待测样本的体积，0.04 mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；T：反应时间，1 h = 60 min；10^3：单位换算系数 1 μmol =10^3 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。

$$\text{ICDHm（U/g）} = \frac{x \times V_{样} \times V_{提} \times 10^3}{W \times V_{样} \times T} = \frac{16.83 \times x}{W}$$

注释：V 样：反应体系中加入待测样本的体积，0.04 mL；V 提：加入提取液的体积，1.01 mL；W：样本质量，g；T：反应时间，1 h = 60 min；10^3：单位换算系数 1 μmol =10^3 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。

$$\text{ICDHm（U/g）} = \frac{x \times V_{样} \times V_{提} \times 10^3}{W \times V_{样} \times T} = \frac{6.73 \times x}{W}$$

注释：V 样：反应体系中加入待测样本的体积，0.04 mL；V 提：1-④中沉淀重悬时加入提取液的体积，0.404 mL；W：样本质量，g；T：反应时间，1 h = 60 min；10^3：单位换算系数 1 μmol =10^3 nmol。

③ ICDHm 总活性计算

ICDHm 总活性=胞浆提取物 ICDHm 活性+线粒体 ICDHm 活性

$$= \frac{16.83 \times x}{W} + \frac{6.73 \times x}{W}$$

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