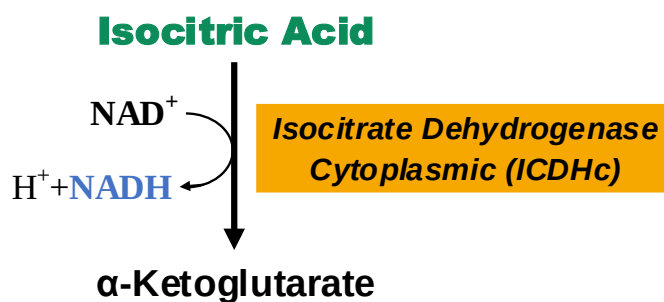




胞浆异柠檬酸脱氢酶（ICDHc）活性检测试剂盒

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 100 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	粉剂×1 瓶	4°C 保存	使用时加入 50 mL 提取液充分溶解
试剂二	粉剂×2 支	4°C 保存	使用时每支加入 275 μL 蒸馏水充分溶解 (配置后可分装-20°C保存, 严禁反复冻融)
试剂三	粉剂×2 支	-20°C 保存	使用时每支加入 275 μL 蒸馏水充分溶解 (配置后可分装-20°C保存, 严禁反复冻融)
ICDHc 工作液的配制 (现用现配): 使用前按试剂一: 试剂二: 试剂三 = 85:1:1 的体积比配置。			

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、1 mL 石英比色皿、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。

②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。

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紫外分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm，蒸馏水调零。
- ②在 1 mL 石英比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)
ICDHc 工作液	950
粗酶液	50

吸光值测定：①迅速混匀并开始计时，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 $\Delta A = A2 - A1$ 。

3.胞浆异柠檬酸脱氢酶（ICDHc）活性计算

- 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。

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

- 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。

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

- 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。

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

- 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。

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

注释： V 提：粗酶液总体积，1 mL；V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.05 mL；V 反总：反应体系总体积，1 mL=0.001 L； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；d：1 mL 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、试剂三和粗酶液均需冰上放置，以免失活，工作液 37°C 水浴中放置；
- ②反应过程中应保持 37°C 恒温，建议在烧杯中装入适量 37°C 蒸馏水，将此烧杯放入 37°C 恒温水浴中，在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中；
- ③准确在 20 s 和 140 s 处完成读数，以保证实验结果的准确性；
- ④若 ΔA 和 A_{140} > 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_{140} < 0.5 以提高检测的灵敏度；
- ⑤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.

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

Liaodong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

