

# 线粒体异柠檬酸脱氢酶 (ICDHm) 检测试剂盒 (微量法)

货号：PMK1111

保存：4℃避光保存 12 个月

规格：48T/96T

适用样本：动植物组织、细胞

## 产品简介

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，在三羧酸循环中异柠檬酸脱氢酶催化异柠檬酸脱羧生成  $\alpha$ -酮戊二酸，同时将 NAD<sup>+</sup> 还原为 NADH。本试剂盒提供了一种简单、方便、快速的异柠檬酸脱氢酶活性检测方法，其原理是 ICDHm 可以催化 NAD<sup>+</sup> 还原生成 NADH，NADH 在 340 nm 处有吸收峰，通过检测 340nm 处光吸收的变化即可计算 ICDHm 酶活性。

## 产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
试剂一	50mL	100mL	4℃保存
试剂二	10mL	20mL	4℃保存
试剂三	1mL	2mL	4℃避光保存
试剂四	10mL	20mL	4℃保存
试剂五	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4℃保存
试剂六	粉剂×1 支	粉剂×1 支	4℃避光保存

## 自备耗材

酶标仪或紫外分光光度计（能测 340nm 处的吸光度）  
 96 孔 UV 板或微量石英比色皿、可调节式移液枪及枪头  
 水浴锅、制冰机，低温离心机  
 去离子水  
 匀浆器（如果是组织样本）

## 试剂准备

**注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。**

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂二即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂三：即用型；使用前，平衡到室温；-20℃避光保存。

试剂四：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂五：临用前配制，对于 48T 试剂盒，请加入 9mL 试剂四；对于 96T 试剂盒，请加入 18mL 试剂四充分溶解。配制好的试剂 4℃保存。

试剂六：临用前配制，对于 48T 试剂盒，请加入 0.5mL 去离子水充分溶解粉剂；对于 96T 试剂盒，请加入 1 mL 去离子水充分溶解粉剂；未用完的试剂分装-20℃避光保存，避免反复冻融。

## 样本制备

组织、细胞和细菌中胞浆蛋白与线粒体蛋白的提取：

1. 准确称取 0.1g 组织或收集 500 万个细胞，加入 1mL 试剂一和 10 $\mu$ L 试剂三，冰浴匀浆；

## 产品说明书

- 离心匀浆液，600g，5min，4℃，收集上清液至另一新的离心管中，舍弃沉淀；
- 再次离心上清，11,000 g，10min，4℃，沉淀即为提取的线粒体，用作第5步操作；
- (选做)上清液即为胞浆提取物，可作为样本用于测定从线粒体泄漏的线粒体异柠檬酸脱氢酶(ICDHm) (此步可选做，可用于判断线粒体提取效果)；
- 在沉淀中加入200μL试剂二和2μL试剂三，充分重悬沉淀，用于下一步线粒体异柠檬酸脱氢酶(ICDHm)活性检测。

**注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存1个月。测定过程中样本和所有试剂在冰上放置，以免变性和失活。**

### 实验步骤

- 酶标仪或紫外分光光度计预热30min以上，调节波长到340nm。紫外分光光度计去离子水调零。
- 试剂五于37℃(哺乳动物)或25℃(其它物种)孵育10min。
- 在96孔UV板或微量石英比色皿中依次加入10μL样本、180μL试剂五和10μL试剂六，迅速混匀后于340nm检测，记录20s和2min20s的吸光值，分别记为A<sub>1</sub>和A<sub>2</sub>，计算ΔA=A<sub>2</sub>-A<sub>1</sub>。

**注意：1. 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ΔA小于0.001可适当加大样本量；如果ΔA大于0.3，可用试剂二稀释样品，计算时结果乘以稀释倍数。**

- 测定反应的温度对测定结果有影响，请控制在25℃(一般物种)或者37℃(哺乳动物)。
- 因通过反应速率计算酶活，使用96孔UV板时请根据操作速度控制一次测定的样本数(通常一次测定4-8个样本)。

### 结果计算

#### A. 使用96孔UV板测定的计算公式

##### 1. 按样本鲜重计算：

单位的定义：每g组织在反应体系中每分钟生成1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

ICDHm上清活性(U/g鲜重)=[ΔA<sub>上清</sub>×V<sub>反应</sub>÷(ε×d)×10<sup>9</sup>]÷(V<sub>样</sub>÷V<sub>提取</sub>×W)÷T=3247.59×ΔA<sub>上清</sub>÷W

ICDHm沉淀活性(U/g鲜重)=[ΔA<sub>沉淀</sub>×V<sub>反应</sub>÷(ε×d)×10<sup>9</sup>]÷(V<sub>样</sub>÷V<sub>样总</sub>×W)÷T=649.52×ΔA<sub>沉淀</sub>÷W

总ICDHm活性(U/g鲜重)=ICDHm上清活性+ICDHm沉淀活性=3247.59×ΔA<sub>上清</sub>÷W+649.52×ΔA<sub>沉淀</sub>÷W

##### 2. 按细胞密度计算：

单位的定义：每1万个细胞在反应体系中每分钟生成1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

ICDHm上清活性(U/10<sup>4</sup> cells)=[ΔA<sub>上清</sub>×V<sub>反应</sub>÷(ε×d)×10<sup>9</sup>]÷(V<sub>样</sub>÷V<sub>提取</sub>×500)÷T=6.5×ΔA<sub>上清</sub>

ICDHm沉淀活性(U/10<sup>4</sup> cells)=[ΔA<sub>沉淀</sub>×V<sub>反应</sub>÷(ε×d)×10<sup>9</sup>]÷(V<sub>样</sub>÷V<sub>样总</sub>×500)÷T=1.3×ΔA<sub>沉淀</sub>

总ICDHm活性(U/g鲜重)=ICDHm上清活性+ICDHm沉淀活性=6.5×ΔA<sub>上清</sub>+1.3×ΔA<sub>沉淀</sub>

V<sub>反应</sub>：反应体系总体积，2×10<sup>-4</sup>L；ε：NADPH摩尔消光系数，6.22×10<sup>3</sup>mol/L/cm；d：0.5cm；10<sup>9</sup>：1mol=1×10<sup>9</sup>nmol；V<sub>样</sub>：加入样本体积，0.01mL；T：反应时间，2min；ΔA<sub>上清</sub>：上清测定值；V<sub>提取</sub>：加入提取液体积，1.01mL；W：样品质量，g；ΔA<sub>沉淀</sub>：沉淀测定值；V<sub>样总</sub>：加入试剂二和试剂三的总体积，0.202mL；500：细胞总数，500万。

#### B. 使用微量石英比色皿测定的计算公式

将上述计算公式中的光径d:0.5cm调整为d:1cm进行计算即可。

### 注意事项

- 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
- 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
- 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
- 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
- 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

### 相关产品：

- PMK1005 柠檬酸合酶(CS)检测试剂盒(微量法)
- PMK1109 琥珀酸脱氢酶(SDH)检测试剂盒(微量法)
- PMK1114 线粒体苹果酸脱氢酶(MDHm)检测试剂盒(微量法)
- PMK1116 丙酮酸(PA)检测试剂盒(微量法)

更多产品详情了解，请关注公众号：

