

细胞质异柠檬酸脱氢酶 (NADP-IDH) 试剂盒说明书

(货号: PB1035F48 分光法 48 样)

有效期: 3 个月

测定意义:

ICDHc (EC 1.1.1.42) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 催化异柠檬酸脱氢脱羧生成 α -酮戊二酸, 同时还原 NADP^+ 生成 NADPH 。ICDHc 是细胞质中除了磷酸戊糖途径外又一种 NADPH 重要来源, 在逆境中该酶活性通常会发生显著变化。

测定原理:

利用 ICDHc 催化 NADP^+ 还原成 NADPH 反应, 在 340 nm 下测定 NADPH 浓度的增加。

所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制:

提取液: 60 mL $\times$ 1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 液体 50 mL $\times$ 1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 粉剂 $\times$ 2 支, 4℃ 保存; 用时每支加 275 μL 双蒸水充分溶解备用;

试剂三: 粉剂 $\times$ 2 支, -20℃ 保存; 用时每支加 275 μL 双蒸水充分溶解备用;

样本的前处理:

1、细菌、细胞或组织样品的制备:

细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照每 200 万细菌或细胞加入 400 μL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (功率 20%, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

组织: 称取约 0.1g 组织, 加入 1 mL 提取液进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定操作表:

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	750
试剂二	10
试剂三	10
样本	30

将上述试剂按顺序加入 1 mL 石英比色皿中, 加样本的同时开始计时, 在 340 nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A_1 ; 迅速将比色皿连同反应液一起放入 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴中, 准确反应 2 分钟; 迅速取出比色皿并擦干, 记录 2 分 20 秒时的吸光度 A_2 。计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

注意事项:

- 1、若 $A_2 - A_1$ 大于 0.5, 需将酶液用提取液稀释, 使 $A_2 - A_1$ 小于 0.5, 可提高检测灵敏度。
- 2、实验时, 试剂二、试剂三和样本在冰上放置, 以免变性和失活; 试剂一 37℃ 或 25℃ 水浴放置。
- 3、比色皿中反应液的温度必须保持 37℃ 或 25℃, 取小烧杯一只装入一定量的 37℃ 或 25℃ 蒸馏水, 将此烧杯放入 37℃ 或 25℃ 水浴锅中。在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中。
- 4、最好两个人同时做此实验, 一个人比色, 一个人计时, 以保证实验结果的准确性。



ICDHc 活力单位的计算:

1、血清（浆）ICDHc 活力的计算:

单位的定义：每升血清（浆）在反应体系中每分钟生成 1 μmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (U/L)} = \text{反应总体积 (800}\mu\text{L)} \div \text{样本体积 (30}\mu\text{L)} \div \text{反应时间 (2min)} \div \text{NADPH 消光系数 (6.22} \times 10^{-3}) \times \Delta A = 2144 \times \Delta A$$

2、组织中 ICDHc 活力的计算:

（1）按样本蛋白浓度计算:

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

$$\text{ICDHc (U/mg prot)} = \text{反应总体积 (800}\mu\text{L)} \div \text{样本体积 (30}\mu\text{L)} \div \text{反应时间 (2min)} \div \text{NADPH 消光系数 (6.22} \times 10^{-3}) \times \Delta A \div \text{蛋白质浓度 (mg/mL)} = 2144 \times \Delta A \div \text{蛋白质浓度 (mg/mL)}$$

（2）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 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (U/g 鲜重)} = \text{反应总体积 (800}\mu\text{L)} \div \text{样本体积 (30}\mu\text{L)} \div \text{反应时间 (2min)} \div \text{NADPH 消光系数 (6.22} \times 10^{-3}) \times \Delta A \div \text{样品鲜重 (g/mL)} = 2144 \times \Delta A \div \text{样品鲜重 (g/mL)}$$

3、细菌或培养细胞中 ICDHc 活力的计算:

（1）按样本蛋白浓度计算:

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

$$\text{ICDHc (U/mg prot)} = \text{反应总体积 (800}\mu\text{L)} \div \text{样本体积 (30}\mu\text{L)} \div \text{反应时间 (2min)} \div \text{NADPH 消光系数 (6.22} \times 10^{-3}) \times \Delta A \div \text{蛋白质浓度 (mg/mL)} = 2144 \times \Delta A \div \text{蛋白质浓度 (mg/mL)}$$

（2）按细菌或细胞密度计算:

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

$$\text{ICDHc (U/10}^4\text{)} = \text{反应总体积 (800}\mu\text{L)} \div \text{样本体积 (30}\mu\text{L)} \div \text{反应时间 (2min)} \div \text{NADPH 消光系数 (6.22} \times 10^{-3}) \times \Delta A \div 500 \text{ (10}^4\text{ 个/mL)} = 4.288 \times \Delta A \text{ (10}^4\text{ 个/mL)}$$