

## 胞浆异柠檬酸脱氢酶（ICDHc）试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

**注 意：**正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 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  $\alpha$ -酮戊二酸，同时还原  $\text{NADP}^+$  生成  $\text{NADPH}$ 。ICDHc 是细胞质中除了磷酸戊糖途径外又一种  $\text{NADPH}$  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  $\text{NADP}^+$  还原成  $\text{NADPH}$  反应，在 340 nm 下测定  $\text{NADPH}$  浓度的增加。

### 所需的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

### 试剂的组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：液体 19 mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；

试剂三：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存；

### 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 1mL 提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20% 或 200W，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：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 0.1g 组织，加入 1mL 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。

### 测定步骤：

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

2、将试剂二和试剂三转移至试剂一中充分溶解；在 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 10min 以上；用不完的试剂分装后 -20℃ 保存，禁止反复冻融。

3、在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10  $\mu$ L 样本和 190  $\mu$ L 试剂一，混匀后立即记录 340nm 处 20s 后吸光值  $A_1$  和 2min 20s 后的吸光值  $A_2$ ，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。计算公式中乘以

相应稀释倍数。

2、若 A2-A1 小于 0.005，可延长反应时间到 5min 或 10min。

#### ICDHc 活力单位的计算：

##### a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、血清（浆）ICDHc 活力的计算：

单位的定义：每 mL 血清（浆）每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T = 1608 \times \Delta A$$

2、组织、细菌或细胞中 ICDHc 活力的计算：

（1）按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 1608 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

（2）按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 1608 \times \Delta A \div W$$

（3）按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (nmol/min/10}^4) = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 3.216 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  L / mol / cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

##### b.用 96 孔板测定的计算公式如下

1、血清（浆）ICDHc 活力的计算：

单位的定义：每 mL 血清（浆）每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T = 3216 \times \Delta A$$

2、组织、细菌或细胞中 ICDHc 活力的计算：

（1）按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 3216 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

（2）按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 3216 \times \Delta A \div W$$

（3）按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ICDHc (nmol/min/10}^4) = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 6.432 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  L / mol / cm；d：96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。