

胞浆异柠檬酸脱氢酶 (ICDHc) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 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 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：60mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 50 mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1 支，4℃保存；

试剂三：粉剂×1 支，4℃保存；

试剂四：粉剂×1 支，-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、 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- 2、 将试剂二转移至试剂一中充分溶解，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴中预热 10min 左右；用不完的试剂 4℃保存。
- 3、 在试剂三中加入 550 μ L 蒸馏水充分溶解，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴中预热 10min 左右；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
- 4、 在试剂四中加入 550 μ L 蒸馏水充分溶解，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴中预热 10min 左右；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

5、操作表：

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	750
试剂三	10
试剂四	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；混匀，在 340nm 波长下记录 20s 时的初始吸光度 A1 和 2min20s 时的吸光度 A2，计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

注意事项：

- 1、若 $A2 - A1$ 大于 0.5，需将酶液用提取液稀释，使 $A2 - A1$ 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：

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。

$$\text{ICDHc (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 2143 \times \Delta A$$

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。

$$\text{ICDHc (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 2143 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{ICDHc (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2143 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{ICDHc (nmol/min/10}^4) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 4.285 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 8×10^{-4} L； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.03 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。