

线粒体异柠檬酸脱氢酶 (ICDHm) 活性检测试剂盒说明书

微量法

货号: AC10396

规格: 100T/48S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 60 mL×1 瓶	4°C保存
提取液二	液体 600 μL×2 支	-20°C保存
提取液三	液体 40 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	常温保存
试剂三	液体 10 mL×1 瓶	4°C保存
试剂四	粉剂×2 支	-20°C保存
试剂五	液体 5 mL×1 瓶	常温保存
试剂六	液体 15 mL×1 瓶	常温保存
标准品	粉剂×1 支	4°C保存

溶液的配制:

- 1、提取液二: 易挥发试剂, 用完后盖紧盖儿后及时放回-20°C保存;
- 2、试剂一: 临用前加入 5 mL 试剂三, 充分溶解待用;
- 3、试剂二: 临用前加入 5 mL 试剂三, 充分溶解待用;
- 4、试剂四: 临用前加入 0.375 mL 双蒸水, 充分溶解待用;
- 5、标准品: 10 mg α -酮戊二酸。临用前加入 684 μ L 蒸馏水, 配成 100 μ mol/mL 标准液;
- 6、工作液的配制: 临用前根据用量将试剂一、试剂二按 1:1 比例混合, 现配现用。

产品说明:

线粒体异柠檬酸脱氢酶 (isocitrate dehydrogenase, ICDHm), 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞的线粒体中, 与线粒体基因表达及线粒体其他的功能有关。异柠檬酸脱氢酶在生物体内有两种存在形式, 以NAD为辅酶的NAD-依赖型异柠檬酸脱氢酶, 和以NADP为辅酶的NADP-依赖型异柠檬酸脱氢酶。

异柠檬酸脱氢酶的主要功能, 是在体内三羧酸循环中, 催化异柠檬酸生成 α -酮戊二酸, 将NAD还原成NADH, 通过测定 α -酮戊二酸的生成量, 可以计算出线粒体异柠檬酸脱氢酶活力高低。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

低温离心机、可见分光光度计/酶标仪、水浴锅/恒温培养箱、微量玻璃比色皿/96孔板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 称取约 0.2 g 组织或收集 1000 万细胞，加入 1mL 提取液一和 10 μ L 提取液二，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
2. 4 $^{\circ}$ C，1000g 离心 10min。将上清液移至另一离心管中，4 $^{\circ}$ C，11000g 离心 15min。
3. 上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的异柠檬酸脱氢酶（此步可选做，可以判断线粒体提取效果）。
4. 在沉淀中加入 400 μ L 提取液三和 4 μ L 提取液二，超声波破碎（功率 40%，超声 5 秒，间隔 9 秒，4min），4 $^{\circ}$ C，10000g 离心 10min，取上清液用于线粒体异柠檬酸脱氢酶活性测定，并且用于蛋白含量测定。

二、测定步骤

- 1、可见分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至505nm，蒸馏水调零。
- 2、将标准品用提取液三稀释至0.6、0.3、0.15、0.075、0.0375、0.01875 μ mol/mL标准溶液。
- 3、操作表（在0.6 mL EP管/96孔板中进行如下操作）：

试剂名称（ μ L）	对照管	测定管	标准管	空白管
上清液	40	40	-	
标准溶液			40	
工作液	40	40	40	40
试剂四	-	4	4	4
蒸馏水	4			40
充分混匀，置于37 $^{\circ}$ C水浴锅/37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中反应1 h				
试剂五	20	20	20	20
充分混匀，置于37 $^{\circ}$ C水浴锅/37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中10 min				
试剂六	96	96	96	96
充分混匀，室温静置 5min，尽快测定 505nm 波长处的吸光值，分别记为 A 测定管、A 对照管、A 标准管、A 空白管，计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管， ΔA 标准=A 标准管-A 空白管。（空白管只需测定 1~2 次）				

三、ICDHm活性计算

1、标准曲线绘制

以各个标准溶液的浓度为x轴，其对应的 ΔA 标准为y轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 带入方程得到x(μ mol/mL)。

2、酶活力计算

酶活定义：每mg组织蛋白在反应体系中每分钟产生1nmol α -酮戊二酸定义为一个酶活性单位。

$$\text{ICDHm酶活力 (U/mg prot)} = x \times V_{\text{上清}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{上清}}) \div T \times 10^3 = x \div \text{Cpr} \times 16.67$$

V_{上清}: 加入上清液体积，0.04mL；Cpr: 样本蛋白浓度，mg/mL，需自行测定；V_{反总}: 反应体系总体积，0.2mL；T: 反应时间，1h=60min；10³: 单位换算系数，1 μ mol=10³nmol。

注意事项：

- 1、为保证实验结果的准确性，需先取1-2个样做预实验，如果测定的吸光值过高（高于1），可用提取液三稀释上清液后再测定。计算结果时注意乘以稀释倍数。
- 2、推荐使用样本蛋白浓度计算酶活，若用样本质量计算，则需加测胞浆提取物酶活，上清和沉淀酶活之和方为总酶活。

3、附：使用样本重量计算公式

A、上清（胞浆）中ICDHm活力计算：

酶活定义：每g组织在反应体系中每分钟产生1nmol α -酮戊二酸定义为一个酶活性单位。

$$\text{ICDHm活性 (U/g 质量)} = x \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \div T \times 10^3 = 16.83 \times x \div W$$

V_{提取}：加入提取液体积，1.01mL；V_样：加入上清液体积，0.04mL；W：样本质量，g；T：反应时间，1h=60min
10³：单位换算系数，1 μ mol=10³nmol。

B、沉淀（线粒体）中ICDHm活力计算：

酶活定义：每g组织在反应体系中每分钟产生1nmol α -酮戊二酸定义为一个酶活性单位。

$$\text{ICDHm活性 (U/g 质量)} = x \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \div T \times 10^3 = 6.73 \times x \div W$$

V_{提取}：沉淀重悬时加入提取液体积，0.404mL；V_样：加入上清液体积，0.04mL；W：样本质量，g；T：反应时间，1h=60min；10³：单位换算系数，1 μ mol=10³nmol。

C、样本ICDHm总活力计算：

样本ICDHm总活力即为上清（胞浆）中ICDHm活力与沉淀（线粒体）中ICDHm活力之和。

$$\text{按样本质量计算：ICDHm (U/g 质量)} = 16.83 \times x \div W + 6.73 \times x \div W$$

实验实例：

- 1、取 0.2g 小鼠肾脏加入 1.5 mL 提取液一和 15 μ L 提取液二，用冰浴匀浆器匀浆。4 $^{\circ}$ C，1000g 离心 10min。将上清液移至另一离心管中，4 $^{\circ}$ C，11000g 离心 15min。上清液即胞浆提取物，在沉淀中加入 600 μ L 提取液三和 6 μ L 提取液二，超声波破碎，4 $^{\circ}$ C，10000g 离心 10min，取上清液，分别按操作步骤检测，用 96 孔板测得：胞浆 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管=0.25-0.25=0，线粒体 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管=0.433-0.279=0.154，带入标准曲线 $y=0.5533x+0.0319$ 计算 x 值，按样本质量计算酶活得：胞浆中 ICDHm 活性 (U/g 质量) = $16.83 \times x \div W = 0$ U/g 质量，线粒体中 ICDHm 活性 (U/g 质量) = $6.73 \times x \div W = 7.43$ U/g 质量，样本总 ICDHm (U/g 质量) = $16.83 \times x \div W + 6.73 \times x \div W = 7.43$ U/g 质量。
- 2、取 0.3g 黑麦草加入 1.5mL 提取液一和 15 μ L 提取液二，用冰浴匀浆器匀浆。4 $^{\circ}$ C，1000g 离心 10min。将上清液移至另一离心管中，4 $^{\circ}$ C，11000g 离心 15min。上清液即胞浆提取物，上清液稀释 2 倍，在沉淀中加入 600 μ L 提取液三和 6 μ L 提取液二，超声波破碎，4 $^{\circ}$ C，10000g 离心 10min，取上清液稀释 2 倍，分别按操作步骤检测，用 96 孔板测得：胞浆 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管=0.377-0.34=0.037，线粒体 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管=0.711-0.649=0.062，带入标准曲线 $y=0.5533x+0.0319$ 计算 x 值，按样本质量计算酶活得：胞浆中 ICDHm 活性 (U/g 质量) = $16.83 \times x \div W \times 2 = 1.55$ U/g 质量，线粒体中 ICDHm 活性 (U/g 质量) = $6.73 \times x \div W \times 2 = 3.66$ U/g 质量，样本总 ICDHm (U/g 质量) = $16.83 \times x \div W \times 2 + 6.73 \times x \div W \times 2 = 5.21$ U/g 质量。

相关发表文献：

[1] Xiao Li, Qi Zhao, Jianni Qi, et al. lncRNA Ftx promotes aerobic glycolysis and tumor progression through the PPAR γ pathway in hepatocellular carcinoma. International Journal of Oncology. May 2018;(IF3.571)

参考文献:

[1] Igamberdiev A U, Gardeström P. Regulation of NAD-and NADP-dependent isocitrate dehydrogenases by reduction levels of pyridine nucleotides in mitochondria and cytosol of pea leaves[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2003, 1606(1-3): 117-125.