

## 胞浆异柠檬酸脱氢酶（ICDHc）试剂盒说明书

微量法 100管/96样

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NADP<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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/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<sup>4</sup>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A1和 2min20s后的吸光值A2，计算 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

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：

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。

$$\text{ICDHc (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div V_{\text{样}} \div T = 1608 \times \Delta A$$

### 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。

$$\text{ICDHc (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1608 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

#### (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。

$$\text{ICDHc (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div W$$

#### (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。

$$\text{ICDHc (nmol/min/104)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3.216 \times \Delta A$$

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。

$$\text{ICDHc (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div V_{\text{样}} \div T = 3216 \times \Delta A$$

#### 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。

$$\text{ICDHc (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 3216 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

#### (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。

$$\text{ICDHc (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3216 \times \Delta A \div W$$

#### (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。

$$\text{ICDHc (nmol/min/104)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 6.432 \times \Delta A$$

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。

