

线粒体异柠檬酸脱氢酶 (ICDHm) 活性测定试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 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

ICDHm (EC 1.1.1.41) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞的线粒体中, 在三羧酸循环中催化异柠檬酸生成 α -酮戊二酸, 同时将 NAD^+ 还原为 NADH , 是三羧酸循环的限速酶之一, 其催化的反应是细胞 NADH 主要来源之一。

测定原理

ICDHm 催化异柠檬酸和 NAD^+ 生成 α -酮戊二酸和 NADH , NADH 在 340nm 下有特征吸收峰, 通过检测 340nm 处光吸收上升速率来反映 ICDHm 活性的高低。

需自备的仪器和用品

紫外分光光度计、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

试剂一: 50mL×1 瓶, -20°C 保存;

试剂二: 10mL×1 瓶, -20°C 保存;

试剂三: 1mL×1 支, -20°C 保存;

试剂四: 液体 60mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂五: 粉剂×1 支, 4°C 保存;

试剂六: 粉剂×1 支, -20°C 保存;

试剂七: 粉剂×1 支, -20°C 保存; 临用前加入 3mL 蒸馏水充分混匀待用; 用不完的试剂分装后 -20°C 保存, 禁止反复冻融。

工作液的配制: 临用前把试剂五、试剂六转移到试剂四中混合溶解待用; 用不完的试剂分装后 -20°C 保存, 禁止反复冻融。

样本的前处理:

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离:

- 1、称取约 0.1g 组织或收集 500 万细菌或细胞, 加入 1mL 试剂一和 10 μL 试剂三, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 2、将匀浆 600g, 4°C 离心 5min。
- 3、弃沉淀, 将上清液移至另一离心管中, 11000g, 4°C 离心 10min。
- 4、上清液即胞浆提取物, 可用于测定从线粒体泄漏的 ICDHm (此步可选做)。
- 5、在步骤④的沉淀中加入 200 μL 试剂二和 2 μL 试剂三, 超声波破碎 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3 秒, 间隔 10 秒, 重复 30 次), 用于线粒体 ICDHm 活性测定。

测定步骤

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm 处, 蒸馏水调零。
- 2、工作液于 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 孵育 5min。
- 3、在 1mL 石英比色皿中依次加入 60 μL 试剂七、80 μL 样本和 1mL 工作液, 混匀, 立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A_1 和 2min20s 时的吸光值 A_2 , 计算 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

ICDHm 活性计算

(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 的 NADH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{ICDHm 活性 (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 1145 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{ICDHm (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 231.3 \times \Delta A \div W$$

(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 NADH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{ICDHm 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.463 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 1.14×10^{-3} L； ϵ ：NADH 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，0.08 mL；V 样总：加入提取液体积，0.202 mL；T：反应时间，2min；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。