

线粒体异柠檬酸脱氢酶 (ICDHm) 活性检测试剂盒 (微量法)

产品货号: BA1406

产品规格: 100管/96样

产品简介:

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。

产品组成:

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

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℃保存;
2. 试剂一: 临用前加入5mL试剂三, 充分溶解待用;
3. 试剂二: 临用前加入5mL试剂三, 充分溶解待用;
4. 试剂四: 临用前加入0.375mL双蒸水, 充分溶解待用;
5. 标准品: 10mg 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。

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0.2g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℃, 1000g离心10min。将上清液移至另一离心管中, 4℃, 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℃, 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0.6mLEP管/96孔板中进行如下操作):



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

试剂名称 (μL)	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°C水浴锅/37°C恒温培养箱中反应1h				
试剂五	20	20	20	20
充分混匀, 置于37°C水浴锅/37°C恒温培养箱中10min				
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 $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{对照管}$, $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。(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 $x(\mu\text{mol/mL})$ 。

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。

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

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; 10^3 : 单位换算系数, $1\mu\text{mol} = 10^3\text{nmol}$ 。

注意事项:

- 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。
- 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为总酶活。
- 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; 10^3 : 单位换算系数, $1\mu\text{mol} = 10^3\text{nmol}$ 。

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; 10^3 : 单位换算系数, $1\mu\text{mol} = 10^3\text{nmol}$ 。

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。

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



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com