

## 线粒体异柠檬酸脱氢酶（ICDHm）检测试剂盒（分光光度法）

**注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。**

### 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 $\alpha$ -酮戊二酸，同时将  $\text{NAD}^+$  还原为  $\text{NADH}$ ，是三羧酸循环的限速酶之一，其催化的反应是细胞  $\text{NADH}$  主要来源之一。

### 测定原理：

ICDHm 催化异柠檬酸和  $\text{NAD}^+$  生成 $\alpha$ -酮戊二酸和  $\text{NADH}$ ， $\text{NADH}$  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。

### 试剂组成和配制：

试剂一：50mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂二：10mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂三：1mL×1 支，-20℃保存；

试剂四：液体 60mL×1 瓶，4℃保存；

试剂五：粉剂×1 支，4℃保存；

试剂六：粉剂×1 支，-20℃保存；

试剂七：粉剂×1 支，-20℃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℃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℃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 10uL 试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 2、将匀浆 600g，4℃离心 5min。
- 3、弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃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 200uL 试剂二和 2uL 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℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）孵育 5min。
- 3、在 1mL 石英比色皿中依次加入 60μL 试剂七、80μL 样本和 1mL 工作液，混匀，立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A1 和 2min20s 时的吸光值 A2，计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

### 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。

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

#### （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。

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

#### （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。

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

V 反总：反应体系总体积， $1.14 \times 10^{-3}$  L；

$\epsilon$ ：NADH 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，0.08 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。