异柠檬酸裂解酶（ICL）检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1456

产品规格：100管/96样

产品简介：

ICL（EC4.1.3.1）主要存在于植物和微生物中，油料作物种子在萌发过程中，通过乙醛酸循环及其他过程将脂肪转变成碳水化合物。ICL是乙醛酸循环的关键酶之一。

ICL催化异柠檬酸降解为乙醛酸和琥珀酸，乙醛酸和NADH在LDH的作用下生成乙醇和NAD，NADH在340nm下有特征吸收峰，监测340nm吸光度的减小速率可间接反应ICL活性。

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。

试验中所需的仪器和试剂:

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、移液器、微量石英比色皿/96孔UV板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体100mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体3mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体4mL×1瓶	2-8℃
试剂三	粉剂×1瓶	-20℃
试剂四	粉剂×1瓶	-20℃
试剂五	液体40μL×1瓶	2-8℃
试剂六	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂七	粉剂×1支	2-8℃

溶液的配制：

1. 提取液：临用前将试剂七加入到提取液中，勿放于-20℃；
2. 试剂三：临用前每瓶加入5mL双蒸水，充分混匀待用；用不完的试剂可分装后-20℃保存，避免反复冻融；
3. 试剂四：临用前每瓶加入5mL双蒸水，充分混匀待用；用不完的试剂可分装后-20℃保存，避免反复冻融；
4. 试剂五：液体置于试剂瓶内EP管中。根据用量按照试剂五:蒸馏水为1:8的体积比例充分混匀，现用现配；
5. 试剂六：临用前每瓶加入5mL双蒸水，充分混匀待用；用不完的试剂4℃保存；
6. 工作液配制：按试剂一：试剂二：试剂三：试剂四：试剂五=29:35:42:42:3的比例将各试剂混合后备用，根据样本数量现用现配。

操作步骤（仅供参考）：

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. 细菌或细胞处理：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 20%，超声 3 秒，间隔 10 秒，重复 30 次），15000g，4℃，离心 20 分钟，取上清，置冰上待测。

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

2. 组织处理：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆；15000g，4℃，离心 20 分钟，取上清，置冰上待测。

二、测定步骤

1. 紫外分光光度计预 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
2. 样本测定

试剂	测定管
工作液（μL）	151
样本（μL）	7
试剂六（μL）	42

将上述试剂按顺序加入微量石英比色皿/96 孔 UV 板中，加试剂六的同时开始计时，在 340nm 波长下记录 10 秒时的初始吸光度 A1，比色后迅速将比色皿连同反应液一起放入 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴中准确反应 2 分钟（如果酶标仪有控温功能可以将温度设置为 37℃或 25℃）；迅速取出比色皿并擦干，340nm 下比色，记录 2 分 10 秒时的吸光度 A2，计算ΔA=A1-A2。

三、ICL 活性计算

A．用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 组织中 ICL 活力的计算：

（1）按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

ICL（U/mg prot）=ΔA÷（ε×d）×V 反总×10^9÷(V 样本×Cpr) ÷T=2297×ΔA÷Cpr

（2）按样本质量计算：

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

ICL（U/g 质量）=ΔA÷（ε×d）×V 反总×10^9÷(W÷V 提取×V 样本) ÷T=2297×ΔA÷W

V 反总：反应总体积，0.2×10^{-3}L；V 样本：加入样本体积，0.035mL；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3L/mol/cm；d：1mL 石英比色皿光径，1cm；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；V 提取：加入提取液体积，1mL；W：样本质量，g；T：反应时间，2min；10^9：单位换算系数，1mol=10^9nmol。

2. 细菌或培养细胞中 ICL 活力的计算：

（1）按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

ICL（U/mg prot）=ΔA÷（ε×d）×V 反总×10^9÷(V 样本×Cpr) ÷T=2297×ΔA÷Cpr

（2）按细菌或细胞数量计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

ICL（U/10^4cell）=ΔA÷（ε×d）×V 反总×10^9÷(500÷V 提取×V 样本) ÷T=4.59×ΔA

V 反总：反应总体积，0.2×10^{-3}L；V 样本：加入样本体积，0.007mL；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3L/mol/cm；d：1mL 石英比色皿光径，1cm；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；V 提取：加入提取液体积，1mL；500：细菌或细胞数量，500 万；T：反应时间，2min；10^9：单位换算系数，1mol=10^9nmol。

B. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 组织中 ICL 活力的计算：

（1）按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

ICL（U/mg prot）=ΔA÷（ε×d）×V 反总×10^9÷(V 样本×Cpr) ÷T=3828×ΔA÷Cpr

（2）按样本质量计算：

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

ICL（U/g 质量）=ΔA÷（ε×d）×V 反总×10^9÷(W÷V 提取×V 样本) ÷T=3828×ΔA÷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

V 反总：反应总体积，0.2×10^{-3}L；V 样本：加入样本体积，0.007mL；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10^{3}L/mol/cm；d：96 孔 UV 板光径，0.5cm；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；V 提取：加入提取液体积，1mL；W：样本质量，g；T：反应时间，2min；10^{9}：单位换算系数，1mol=10^{9}nmol。

2. 细菌或培养细胞中 ICL 活力的计算：

（1）按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

ICL（U/mg prot）=ΔA÷（ε×d）×V 反总×10^{9}÷(V 样本×Cpr) ÷T=3828×ΔA÷Cpr

（2）按细菌或细胞数量计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

ICL（U/10^{4} cell）=ΔA÷（ε×d）×V 反总×10^{9}÷(500÷V 提取×V 样本) ÷T=7.65×ΔA

V 反总：反应总体积，0.2×10^{-3}L；V 样本：加入样本体积，0.007mL；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10^{3}L/mol/cm；d：96 孔 UV 板光径，0.6cm；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；V 提取：加入提取液体积，1mL；500：细菌或细胞数量，500 万 ；T：反应时间，2min；10^{9}：单位换算系数，1mol=10^{9}nmol。

注意事项：

1. 测定过程中样本和所有试剂在冰上放置，以免变性和失活。
2. 比色皿中反应液的温度必须保持 37℃或 25℃，取小烧杯一只装入一定量的 37℃或 25℃蒸馏水，将此烧杯放入 37℃或 25℃水浴锅中。在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中。