

## 异柠檬酸裂解酶 (ICL) 检测试剂盒 (紫外分光光度法)

产品货号: BA1455

产品规格: 50管/48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、台式离心机、水浴锅、移液器、1mL石英比色皿、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50mL×1瓶  | 2-8℃ |
| 试剂一  | 液体8mL×1瓶   | 2-8℃ |
| 试剂二  | 液体10mL×1瓶  | 2-8℃ |
| 试剂三  | 粉剂×2瓶      | -20℃ |
| 试剂四  | 粉剂×2瓶      | -20℃ |
| 试剂五  | 液体100μL×1瓶 | 2-8℃ |
| 试剂六  | 粉剂×2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6mL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6mL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6mL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。
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



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

QQ: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

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) | 755 |
| 样本 (μL)  | 35  |
| 试剂六 (μL) | 210 |

将上述试剂按顺序加入 1mL 石英比色皿中，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；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  $\Delta A = A1 - A2$ 。

## 三、ICL 活性计算

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。

$$ICL (U/mg \text{ prot}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样本}} \times Cpr) \div T = 2297 \times \Delta A \div Cpr$$

(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。

$$ICL (U/g \text{ 质量}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 2297 \times \Delta A \div W$$

V 反总：反应总体积， $1.0 \times 10^{-3}L$ ；V 样本：加入样本体积，0.035mL； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 L/mol/cm$ ；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， $1mol = 10^9 nmol$ 。

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。

$$ICL (U/mg \text{ prot}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样本}} \times Cpr) \div T = 2297 \times \Delta A \div Cpr$$

(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。

$$ICL (U/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (500 \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 4.59 \times \Delta A$$

V 反总：反应总体积， $1.0 \times 10^{-3}L$ ；V 样本：加入样本体积，0.035mL； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 L/mol/cm$ ；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， $1mol = 10^9 nmol$ 。

## 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。



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