

异柠檬酸裂解酶 (ICL) 活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：AC10377

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 10 mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	粉剂×2 瓶	-20°C保存
试剂四	粉剂×2 瓶	-20°C保存
试剂五	液体 100μL×1 支	4°C保存
试剂六	液体 13mL×1 瓶	4°C保存
试剂七	粉剂×1 支	4°C保存

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°C；
- 2、试剂三：临用前取 1 瓶加入 6.25mL 蒸馏水，充分混匀待用；用不完的试剂-20°C分装保存 2 周，避免反复冻融；
- 3、试剂四：临用前取 1 瓶加入 6.6mL 蒸馏水，充分混匀待用；用不完的试剂-20°C分装保存 2 周，避免反复冻融；
- 4、试剂五：使用前需先离心。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、工作液配制：按试剂一：试剂二：试剂三：试剂四：试剂五=145:175:210:210:15 的比例将各试剂混合后备用（共 755μL，1T 的量），根据样本数量现用现配。

产品说明：

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。

需自备的仪器和用品：

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。

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、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 200W，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，置冰上待测。

二、测定步骤

1. 紫外分光光度计预热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。

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

(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。

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

V_{反应总}: 反应总体积， $1.0 \times 10^{-3}\text{L}$ ；V_{样本}: 加入样本体积，0.035mL； ϵ : NADH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3\text{L/mol/cm}$ ；d: 1mL石英比色皿光径，1cm；C_{pr}: 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， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

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。

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

(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。

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

V_{反应总}: 反应总体积， $1.0 \times 10^{-3}\text{L}$ ；V_{样本}: 加入样本体积，0.035mL； ϵ : NADH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3\text{L/mol/cm}$ ；d: 1mL石英比色皿光径，1cm；C_{pr}: 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， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

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°C或 25°C，取小烧杯一只装入一定量的 37°C或 25°C蒸馏水，将此烧杯放入 37°C或 25°C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。

相关发表文献：

[1] Sun J, Jia H, Wang P, et al. Exogenous gibberellin weakens lipid breakdown by increasing soluble sugars levels in early germination of zanthoxylum seeds[J]. Plant science, 2019, 280: 155-163.

参考文献：

[1] Maffei M, Berteaux C M, Garneri F, et al. Effect of benzoic acid hydroxy-and methoxy-ring substituents during cucumber (*Cucumis sativus* L.) germination. I.: Isocitrate lyase and catalase activity[J]. Plant Science, 1999, 141(2): 139-147.

相关系列产品：

- AC10561/AC10562 乙酸激酶（ACK）活性检测试剂盒
- AC10555/AC10556 植物脱氢酶（PDHA）活性检测试剂盒