

异柠檬酸裂解酶（ICL）活性检测试剂盒说明书

微量法

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：BC2035

规格：100T/96S

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 5 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 4 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂四	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂五	液体 40μL×1 支	2-8℃保存
试剂六	液体 5mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂七	粉剂×1 支	2-8℃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℃；
- 2、试剂三：临用前每瓶加入 2.5mL 蒸馏水，充分混匀待用；用不完的试剂-20℃分装保存 2 周，避免反复冻融；
- 3、试剂四：临用前每瓶加入 5mL 蒸馏水，充分混匀待用；用不完的试剂-20℃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=29μL:35μL:42μL:42μL:3μL的比例将各试剂混合后备用（共151μL，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。

需自备的仪器和用品：

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。

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/酶标仪预热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)	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，比色后迅速将微量石英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℃）；迅速取出微量石英比色皿并擦干，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

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。

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

(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。

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

V反应总：反应总体积，0.2×10⁻³L；V样本：加入样本体积，0.007mL；ε：NADH摩尔消光系数，6.22×10³L/mol/cm；

d：微量石英比色皿光径，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；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol。

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。

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

V反应总：反应总体积，0.2×10⁻³L；V样本：加入样本体积，0.007mL；ε：NADH摩尔消光系数，6.22×10³L/mol/cm；

d：微量石英比色皿光径，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；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol。



B. 用96孔UV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。

$$\text{ICL (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样本}} \times \text{Cpr}) \div T = 3828 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{ICL (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 3828 \times \Delta A \div W$$

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；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。

$$\text{ICL (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样本}} \times \text{Cpr}) \div T = 3828 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{ICL (U/10}^4\text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (500 \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 7.65 \times \Delta A$$

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， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

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、微量石英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。在反应过程中把微量石英比色皿连同反应液放在此烧杯中。96 孔 UV 板测定时，不推荐同时测多个样本。

相关发表文献：

- [1] Cai Y, Zhai L, Wu K, Li Z, Gu Z, Wang Y, Cui X, Zhou T, Ruan R, Liu T, Liu Y, Zhang Q. Mechanisms of promotion in the heterotrophic growth of *Chlorella vulgaris* by the combination of sodium acetate and hydrolysate of broken rice. *Bioresour Technol.* 2022 Nov;364:127965. doi: 10.1016/j.biortech.2022.127965. Epub 2022 Sep 14. PMID: 36113821.
- [2] Luo Y, Pang J, Peng C, Ye J, Long B, Tong J, Shi J. Cr(VI) Reduction and Fe(II) Regeneration by *Penicillium oxalicum* SL2-Enhanced Nanoscale Zero-Valent Iron. *Environ Sci Technol.* 2023 Aug 1;57(30):11313-11324. doi: 10.1021/acs.est.3c01390. Epub 2023 Jul 20. PMID: 37474249.
- [3] Ma J, Li T, Luo M, Lei B. Single-Component Self-Healing Antibacterial Anti-Inflammatory Intracellular-Antioxidative Poly(itaconic acid-pluronic) Hydrogel for Rapid Repair of MRSA-Impaired Wound. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2023 Jul 19;15(28):33413-33424. doi: 10.1021/acsami.3c05383. Epub 2023 Jul 2. PMID: 37394732.
- [4] Zhou L, Lu L, Chen C, Zhou T, Wu Q, Wen F, Chen J, Pritchard HW, Peng C, Pei J, Yan J. Comparative changes in sugars and lipids show evidence of a critical node for regeneration in safflower seeds during aging. *Front Plant Sci.* 2022





Oct 27;13:1020478. doi: 10.3389/fpls.2022.1020478. PMID: 36388552; PMCID: PMC9661361.

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:

BC3170/BC3175 乙酸激酶 (ACK) 活性检测试剂盒

BC3120/BC3125 植物脱氢酶 (PDHA) 活性检测试剂盒

