

## Isocitrate Lyase Activity Assay Kit

## 异柠檬酸裂解酶 (ICL) 试剂盒说明书

货号: G0867W | 方法: 微板法 | 规格: 96 样

## 一、产品简介:

异柠檬酸裂解酶 (ICL, EC4.1.3.1) 是乙醛酸循环的关键酶之一, 主要存在于植物和微生物中; 在油料作物种子在萌发过程中, 通过脂肪酸的 $\beta$ -氧化和乙醛酸循环将脂肪酸转变成碳水化合物。因此测定 ICL 活性对了解油类种子的代谢途径和物质转化, 以及种子活力情况有重要意义。

异柠檬酸裂解酶 (ICL) 催化分解异柠檬酸形成一分子琥珀酸和一分子乙醛酸。乙醛酸和二硝基苯肼形成乙醛酸苯肼, 且在碱性条件下显褐色, 其颜色深浅与乙醛酸含量呈正比。因此可以用比色法测定乙醛酸含量, 进而计算得出 ICL 活性。

该酶催化反应: isocitrate = succinate + glyoxylate。

## 二、试剂盒的组成和配制:

| 试剂名称 | 规格           | 保存要求  | 备注                             |
|------|--------------|-------|--------------------------------|
| 提取液  | 液体 100mL×1 瓶 | 4℃ 保存 |                                |
| 试剂一  | 液体 20mL×1 瓶  | 4℃ 保存 |                                |
| 试剂二  | 粉剂 mg×1 瓶    | 4℃ 保存 | 临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 5mL 试剂一溶解备用; |
| 试剂三  | 液体 4mL×1 瓶   | 4℃ 保存 |                                |
| 试剂四  | 液体 30mL×1 瓶  | 4℃ 保存 |                                |
| 标准品  | 粉剂 mg×1 支    | 4℃ 保存 | 若重新做标曲, 则用到该试剂                 |

## 三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、低温台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

## 四、异柠檬酸裂解酶 (ICL) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

## 1、样本制备:

## ① 组织样本:

称取约 0.1g 组织 (水分含量高的样本可取约 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 12000rpm, 4℃ 离心 15min, 取上清置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 5~10: 1 的比例进行提取

## ② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 ( $10^4$ ): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

## 2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 445nm。

② 所有试剂解冻至室温。

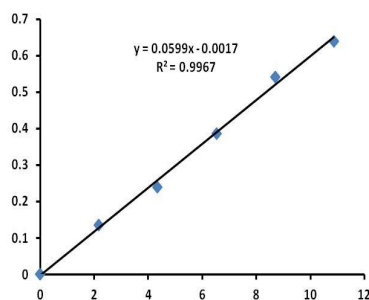
③ 在 96 孔板中依次加入:

| 试剂名称 (μL)                                                                                                    | 测定管 | 对照管 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 样本                                                                                                           | 10  |     |
| 试剂一                                                                                                          | 50  | 50  |
| 试剂二                                                                                                          | 20  | 20  |
| 混匀, 于 30℃ 孵育 30min                                                                                           |     |     |
| 试剂三                                                                                                          | 20  | 20  |
| 样本                                                                                                           |     | 10  |
| 混匀, 于 30℃ 孵育 10min                                                                                           |     |     |
| 试剂四                                                                                                          | 150 | 150 |
| 混匀, 25℃ 孵育 5min, 立即于 445nm 处读取吸光值 A (15min 内完成检测), $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。 |     |     |

注意: 本操作流程适用于绝大多数常规样本检测, 实验条件可根据实际样本状态适度微调; 针对特殊类型样本, 我司技术支持可提供专属优化建议。

## 五、结果计算:

1、标准曲线方程:  $y = 0.0599x - 0.0017$ ,  $x$  是标准品摩尔质量 (nmol),  $y$  是  $\Delta A$ 。



标准曲线示意图

说明: 标准曲线由标准品测定获得, 具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

2、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每小时裂解 1nmol 异柠檬酸生成 1nmol 乙醛酸为一个酶活单位。

$$ICL(nmol/h/mg \text{ prot}) = [(\Delta A + 0.0017) \div 0.0599] \div (V1 \times Cpr) \div T = 3338.9 \times (\Delta A + 0.0017) \div Cpr$$

3、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每小时裂解 1nmol 异柠檬酸生成 1nmol 乙醛酸为一个酶活力单位。

$$ICL(nmol/h/g \text{ 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0022) \div 0.0599] \div (W \times V1 \div V) \div T = 3338.9 \times (\Delta A + 0.0017) \div W$$

4、按细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 每 1 万个细菌/细胞每小时裂解 1nmol 异柠檬酸生成 1nmol 乙醛酸为一酶活单位。

$$ICL(nmol/h/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0022) \div 0.0599] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 6.68 \times (\Delta A + 0.0017)$$

V---加入提取液体积, 1 mL; V1---加入样本体积, 0.01mL; 标准品 Mr---92.05;

T---反应时间, 30min=0.5h; W---样本质量, g; 500---细胞数量;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。