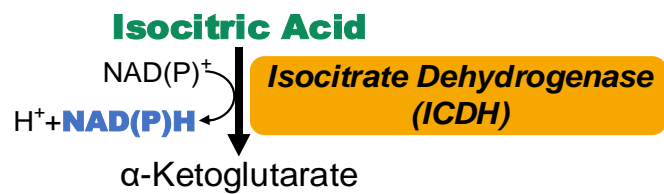




异柠檬酸 (ICA) 含量检测试剂盒
Isocitric Acid (ICA) Content Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



异柠檬酸 (ICA) 含量检测试剂盒

Isocitric Acid (ICA) Content Assay Kit

一、产品描述

异柠檬酸是生物体代谢过程中重要的中间产物，作为三羧酸循环过程中的代谢物之一，由柠檬酸在乌头酸酶的作用下可逆地生成，并且能够通过异柠檬酸脱氢酶的作用氧化脱羧生成 α -酮戊二酸，此外还可以在异柠檬酸裂合酶的作用下生成琥珀酸与乙醛酸，在生物体内参与多种代谢过程，在细胞的能量生成、代谢调节以及疾病发生发展等过程中具有重要意义。

异柠檬酸在异柠檬酸脱氢酶 (ICDH) 的作用下氧化脱羧生成 α -酮戊二酸，同时伴随 NAD^+ 或 NADP^+ 被还原为 NADH 或 NADPH ， NADH 和 NADPH 均在 340 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可定量检测异柠檬酸含量。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液 A	液体 110 mL×1 瓶	4°C 保存	-
提取液 B	液体 20 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	液体 250 μL ×1 支	4°C 保存	使用前按试剂二：蒸馏水=1:9 的体积比配制 (根据使用量现用现配，即为试剂二应用液)
试剂三	粉剂×1 瓶	4°C 保存	使用前加入 1.3 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存 4 周，避免反复冻融)
试剂四	粉剂×1 瓶	4°C 保存	-
标准品	粉剂×1 支	4°C 保存	使用前加入 1 mL 蒸馏水充分溶解 (即为 20 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 异柠檬酸标准液)
标准稀释液的制备 (现用现配): 使用前将 20 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 异柠檬酸标准液使用蒸馏水稀释至 12、10、8、4、2、1、0.5 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 即为标准稀释液。			

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：酶标仪、96孔UV板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1. 样本处理（可根据预实验结果适当调整样品量及比例）

①组织：按照组织质量（g）：提取液 A 体积（mL）为 1：（5-10）的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液 A）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 12000 g 离心 10 min，吸取 800 μL 上清液至离心管中，加入 150 μL 提取液 B 充分混匀至无气泡产生，4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液 A 体积（mL）为（500-1000）：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液 A）处理样品，冰浴超声破碎细菌或细胞（功率 300 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 3 min），4℃ 12000 g 离心 10 min，吸取 800 μL 上清液至离心管中，加入 150 μL 提取液 B 充分混匀至无气泡产生，4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

③培养液等液体样本：吸取 500 μL 液体样本，加入 1 mg 左右试剂四充分混匀，沸水浴处理 5 min（密封以防止水分散失），冷却至室温，4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

注：提取液 B 加入后会产生大量气泡，应缓慢加入并吹打混匀至无气泡产生，建议使用 2 mL 离心管。

2. 测定步骤

①酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm。

②检测工作液的制备（现用现配）：根据使用量按试剂一：试剂二应用液：试剂三=15:2:1 的体积比配制，充分混匀即为检测工作液。

③标准稀释液的制备（现用现配）：使用前将 20 μmol/mL 异柠檬酸标准液使用蒸馏水稀释至 12、10、8、4、2、1、0.5 μmol/mL 即为标准稀释液。

序号	1	2	3	4	5	6	7
稀释前浓度（μmol/mL）	20	20	10	8	4	2	1
标准液体积（μL）	300	300	400	200	200	200	200
蒸馏水体积（μL）	200	300	100	200	200	200	200
稀释后浓度（μmol/mL）	12	10	8	4	2	1	0.5

③在 96 孔 UV 板中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	标准组 (μL)	空白组 (μL)
待测样本	20	-	-
标准稀释液	-	20	-
蒸馏水	-	-	20
检测工作液	180	180	180

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 10 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A1 测定、A1 标准和 A1 空白；②37°C 恒温准确反应 600 s，测定 610 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A2 测定、A2 标准和 A2 空白；③计算 ΔA 测定 = (A2 测定 - A1 测定) - (A2 空白 - A1 空白)， ΔA 标准 = (A2 标准 - A1 标准) - (A2 空白 - A1 空白)。注：标准组和空白组只需测定 1-2 次。

标准曲线的建立：以 12、10、8、4、2、1、0.5 $\mu\text{mol/mL}$ 为横坐标 (x)，以其对应的 ΔA 标准为纵坐标 (y)，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 测定带入公式中得到 x ($\mu\text{mol/mL}$)。

3. 异柠檬酸 (ICA) 含量计算

①按组织蛋白含量计算

$$\text{异柠檬酸含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) = \frac{x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提 B}}) \times V_{\text{提 A}}}{\text{Cpr} \times W \times V_{\text{上清}}} = \frac{1.1875 \times x}{\text{Cpr} \times W}$$

②按组织样本质量计算

$$\text{异柠檬酸含量 } (\mu\text{mol/g}) = \frac{x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提 B}}) \times V_{\text{提 A}} \times D}{W \times V_{\text{上清}}} = \frac{1.1875 \times x \times D}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

$$\text{异柠檬酸含量 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = \frac{x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提 B}}) \times V_{\text{提 A}} \times D}{\text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{上清}}} = \frac{1.1875 \times x \times D}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

$$\text{异柠檬酸含量 } (\mu\text{mol/mL}) = x \times D$$

注释： V 提 A：提取过程中加入提取液 A 的体积，1 mL；V 上清：提取过程中吸取上清液的体积，0.8 mL；V 提 B：提取过程中加入提取液 B 的体积，0.15 mL；Cpr：样本蛋白含量，mg/g；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计。

四、注意事项

- ①若 A 测定或 ΔA 测定超出标准吸光值线性范围：高于最高值建议将待测样本使用蒸馏水适当稀释后再进行测定；低于最低值建议制备更高浓度样本后再进行测定，计算时相应修改；
- ②准确在 10s 和 610s 处完成吸光值测定，以保证实验结果的准确性和重复性；若同时测定多个样本时，应使用多道移液器且分批进行测定，以确保组间反应时间一致；
- ③若测定吸光值大于 3.0，建议检查比色材质是否为 **96 孔 UV 板**；
- ④提取液中含有蛋白沉淀组分，待测样本不能用于蛋白浓度的测定，若需要使用蛋白浓度计算结果，建议使用 PBS 或生理盐水制备样本后再进行蛋白浓度测定；
- ⑤为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

Notes:

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

