

异柠檬酸裂解酶（isocitrate lyase, ICL）试剂盒

微量法 100 管/96 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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。

测定原理：

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。

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 孔板、研钵、冰和蒸馏水

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 15mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃保存；

试剂三：液体 360 μL×1 支，4℃保存；

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃保存；

样本的前处理：

1、细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（10⁴ 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 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 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；15000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、组织：按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。15000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤：

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

2、样本测定

(1) 工作液的配置，将试剂二和试剂三转移至试剂一中，充分混合溶解，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 5min；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；(2) 在试剂四中加入 4mL 蒸馏水，充分溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

(3) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μ L 样本、150 μ L 工作液和 40 μ L 试剂四，混匀，立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A1 和 2min20s 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

ICL 活性计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白中每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。ICL (nmol/min/mg prot) = $[\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 1608 \times \Delta A \div \text{Cpr}$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

ICL (nmol/min/g 鲜重) = $[\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 1608 \times \Delta A \div W$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。ICL (nmol/min/104 cell) = $[\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 3.215 \times \Delta A$

V 反总：反应体系总体积，2 $\times 10^{-4}$ L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数，6.22 $\times 10^3$ L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白中每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。ICL (nmol/min/mg prot) = $[\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 3216 \times \Delta A \div \text{Cpr}$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

ICL (nmol/min/g 鲜重) = $[\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 3216 \times \Delta A \div W$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。ICL (nmol/min/104 cell) = $[\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 6.25 \times \Delta A$

V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；d：

96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 min；
Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。