

异柠檬酸裂解酶 (isocitrate lyase, ICL) 试剂盒

分光光度法 50 管/48 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、台式离心机、水浴锅、移液器、1mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水

试剂组成和配制：

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 15mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：液体 15mL×1 瓶，4℃保存；

试剂三：粉剂×3 瓶，-20℃保存；临用前每瓶加入 5mL 蒸馏水，充分混匀待用；用不完的试剂仍-20℃保存；

试剂四：粉剂×3 瓶，-20℃保存；临用前每瓶加入 5mL 蒸馏水，充分混匀待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

试剂五：液体 800 μL×2 支，4℃保存；临用前每支加入 560 μL 蒸馏水，充分混匀待用；用不完的试剂仍 4℃保存；

试剂六：粉剂×3 瓶，4℃保存；临用前每瓶加入 5mL 蒸馏水，充分混匀待用。用不完的试剂-20℃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:

试剂	测定管
试剂一 (μL)	300
试剂二 (μL)	250
试剂三 (μL)	300
试剂四 (μL)	300
试剂五 (μL)	20
样本 (μL)	50

混匀, 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴 5min

振荡水浴	20 min
------	--------

将上述试剂按顺序加入 1 mL 玻璃比色皿中, 加试剂六的同时开始计时, 在 340nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A1 和 2 分 20 秒时的吸光度 A2, 计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

注意: 若一次性测定样本较多, 可将试剂一、二、三、四、五和样本按比例配成混合液,

在 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴 5min 以上, 测定时加入 1220μL 混合液和 300μL 试剂六测定。

ICL 活性计算:

(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) = $[\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 2443 \times \Delta A \div Cpr$

(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) = $[\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 2443 \times \Delta A \div W$

(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) = $[\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 4.886 \times \Delta A$

V 反总: 反应体系总体积, 1.52 × 10⁻³ L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22 × 10³ L / mol /cm; d:

比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.05 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。