

异柠檬酸裂解酶 (isocitrate lyase, ICL) 试剂盒说明书

(分光法 48 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 β -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: $\text{isocitrate} = \text{succinate} + \text{glyoxylate}$ 。

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 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 25mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 7mL 试剂一溶解备用;
试剂三	液体 6mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	液体 45mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、低温台式离心机、可调式移液器、恒温水浴锅、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°C 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°C 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 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 445nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温。在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	30	
试剂一	150	150

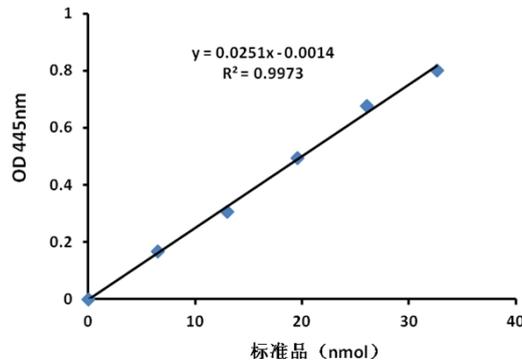
试剂二	60	60
混匀，于 30℃ 孵育 30min		
试剂三	60	60
样本		30
混匀，于 30℃ 孵育 10min		
试剂四	450	450
混匀，25℃ 孵育 5min，全部液体立即转移至 1mL 玻璃比色皿中，立即于 445nm 处测定吸光值 A（15min 内完成检测）， $\Delta A=A$ 测定-A 对照（每个样本做一个自身对照）。		

【注】1.若 A 测定超过 1.8，可降低样本量 V1（如 15 μ L，另外 15 μ L 用蒸馏水补齐，总体积 30 μ L 保持不变）。则改变后的加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。

2.若 ΔA 的值在零附近徘徊，则可增加样本量 V1（如 60 μ L，则试剂一相应减少），或增加样本取样质量（W），则改变后的加样体积 V1 和取样质量 W 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0251x - 0.0014$ ，x 是标准品摩尔质量（nmol），y 是 ΔA 。



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。

$$ICL(\text{nmol/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0014) \div 0.0251] \div (V1 \times Cpr) \div T = 2656 \times (\Delta A + 0.0014) \div Cpr$$

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。

$$ICL(\text{nmol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0014) \div 0.0251] \div (W \times V1 \div V) \div T = 2656 \times (\Delta A + 0.0014) \div W$$

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。

$$ICL(\text{nmol/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0014) \div 0.0251] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 5.3 \times (\Delta A + 0.0014)$$

V---加入提取液体积，1 mL； V1---加入样本体积，0.03mL； 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。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（1mg/mL）：临用前加 1mL 蒸馏水溶解，（母液需在两天内用且 -20℃ 保存）。
- 2 把母液稀释成以下浓度：0, 0.03, 0.06, 0.09, 0.12, 0.15mg/mL。也可根据实际来调整浓度。
- 3 依据测定管的加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。