

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

分光光度法 50 管/48 样

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。

试剂组成和配制:

产品名称	OT003-50T/48S	Storage
提取液: 液体	50ml	4°C
试剂一: 液体	15ml	4°C
试剂二: 液体	15ml	4°C
试剂三: 粉剂	3 瓶	-20°C
试剂四: 粉剂	3 瓶	-20°C
试剂五: 液体	800 μ l \times 2	4°C
试剂六: f 粉剂	3 瓶	4°C
说明书	一份	

试剂三: 粉剂 \times 3 瓶, -20°C 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°C 保存;

试剂四: 粉剂 \times 3 瓶, -20°C 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°C 保存, 禁止反复冻融;

试剂五: 液体 800 μ l \times 2 支, 4°C 保存; 临用前每支加入 560 μ l 蒸馏水, 充分混匀待用; 用不完的试剂仍 4°C 保存;

试剂六: 粉剂 \times 3 瓶, 4°C 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°C 保存。

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

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司

江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号



服务热线: 0518-81263339

官网:<http://www.bio149.com>

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、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 570nm，蒸馏水调零。
- 2、加样表(在 1.5ml 棕色 EP 管中按下表依次加样)：

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℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 5min	
试剂六 (μl)	300

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℃（哺乳动物）或 25℃（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。

$$\text{ICL (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 2443 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{ICL (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2443 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{ICL (nmol/min /10^4 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 4.886 \times \Delta A$$



V 反总: 反应体系总体积, 1.52×10^{-3} L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 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。

