

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

微量法 100 管/96 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	OT004-100T/96S	Storage
提取液：液体	100ml	4°C
试剂一：液体	15ml	4°C
试剂二：粉剂	1 瓶	-20°C
试剂三：液体	360 μ l	4°C
试剂四：粉剂	1 瓶	4°C
说明书	一份	

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

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°C 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°C 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°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴 5min; 用不完的试剂分装后-20°C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°C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。

$$\text{ICL (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1608 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{ICL (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{ICL (nmol/min/10^4 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3.215 \times \Delta A$$

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。

$$\text{ICL (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 3216 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{ICL (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3216 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{ICL (nmol/min /10^4 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 6.25 \times \Delta A$$

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: 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。

