

## 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（10<sup>4</sup> 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℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 5min

振荡时间（min）	30
-----------	----

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。ICL (nmol/min /mg prot) =  $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 2443 \times \Delta A \div \text{Cpr}$

**(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。

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， $1.52 \times 10^{-3}$  L； $\epsilon$ ：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，0.05 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。