

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

(货号: G0867F 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℃ 保存 | |
| 试剂一 | 液体 25mL×1 瓶 | 4℃ 保存 | |
| 试剂二 | 粉剂 mg×1 瓶 | 4℃ 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℃ 保存 | |
| 试剂四 | 液体 45mL×1 瓶 | 4℃ 保存 | |
| 标准品 | 粉剂 mg×1 支 | 4℃ 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℃ 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℃ 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 |

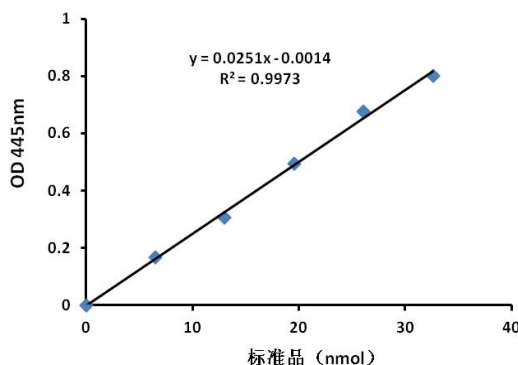
| | | |
|--|-----|-----|
| 试剂二 | 60 | 60 |
| 混匀, 于 30℃ 孵育 30min | | |
| 试剂三 | 60 | 60 |
| 样本 | | 30 |
| 混匀, 于 30℃ 孵育 10min | | |
| 试剂四 | 450 | 450 |
| 混匀, 25℃ 孵育 5min, 全部液体立即转移至 1mL 玻璃比色皿中, 立即于 445nm 处测定吸光值 A (15min 内完成检测), $\Delta A = A$ 测定 - A 对照 (每个样本做一个自身对照)。 | | |

【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。