

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。

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 800μL×2 支, 4℃ 保存; 临用前每支加入 560μL 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 (10^4 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	
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 1220 μ L 混合液和 300 μ L 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。

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

(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。

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

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。