

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。

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

试剂组成和配制:

提取液: 液体 100mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 液体 15mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 粉剂×1 瓶, -20℃ 保存;

试剂三: 液体 360 μL×1 支, 4℃ 保存;

试剂四: 粉剂×1 瓶, 4℃ 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:

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℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 5min; 用不完的试剂分装后 -20℃ 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℃ 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 μL 样本、150 μL 工作液和 40 μL 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。

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

(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。

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

V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} 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，0.01 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。

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

V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 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。