

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

(货号: BP10413F 分光法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 25mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4°C避光保存	1. 开盖前注意使粉剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 7mL 试剂一溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 6mL×1 瓶	4°C避光保存	
试剂四	液体 45mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉剂 1 支	4°C避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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°C 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 液体样品: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

③ 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°C 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（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、检测步骤：

- ① 分光光度计预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），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：

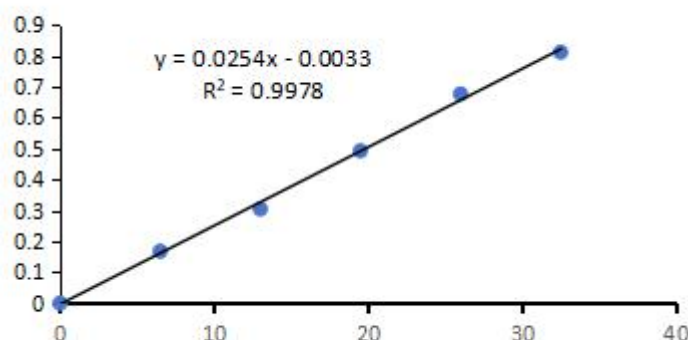
试剂组分（μL）	测定管	对照管
样本	30	
试剂一	150	150
试剂二	60	60
混匀，于 30℃ 孵育 30min		
试剂三	60	60
样本		30
混匀，于 30℃ 孵育 10min		
试剂四	450	450
混匀，25℃ 孵育 5min，全部液体立即转移至 1mL 玻璃比色皿中，立即于 445nm 处测定吸光值 A（15min 内完成检测）， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

【注】1. 若 A 测定超过 1.8，可降低样本量 V1（如 15μL，另外 15μL 用蒸馏水补齐，总体积 30μL 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 60μL，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： $y = 0.0254x - 0.0033$ ，x 是标准品摩尔质量（nmol），y 是 ΔA 。



2、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。

$$ICL(\text{nmol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0033) \div 0.0254] \div (W \times V1 \div V) \div T = 2624.67 \times (\Delta A + 0.0033) \div W$$

3、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。

$$ICL(\text{nmol/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0033) \div 0.0254] \div (V1 \times Cpr) \div T = 2624.67 \times (\Delta A + 0.0033) \div Cpr$$

4、按照液体体积计算：

酶活定义：每毫升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。

$$ICL(\text{nmol/min/mL}) = [(\Delta A + 0.0033) \div 0.0254] \div V1 \div T = 2624.67 \times (\Delta A + 0.0033) \times \Delta A$$

5、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。

$$ICL(nmol/h/10^4 \text{ cell})=[(\Delta A+0.0033)\div 0.0254]\div (500\times V1\div V)\div T=5.25\times (\Delta A+0.0033)$$

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，万；

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 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算；
- 2 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）；
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.03, 0.06, 0.09, 0.12, 0.15mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 200uL，加入 1.12mL 蒸馏水，混匀得到 0.15mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.03	0.06	0.09	0.12	0.15
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
蒸馏水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 5 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	30	
蒸馏水		30
试剂一	150	150
试剂二	60	60
混匀，于 30℃孵育 30min		
试剂三	60	60
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 处读取吸光值 A（15min 内完成检测）， $\Delta A=A$ 标准-A0 浓度。		