

异柠檬酸裂解酶（isocitrate lyase, ICL）试剂盒说明书

（微板法 96 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 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 20mL×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 5mL 试剂一溶解备用；
试剂三	液体 4mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	液体 30mL×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：

酶标仪、96 孔板、低温台式离心机、可调式移液器、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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 445nm。

② 所有试剂解冻至室温。

③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（ μL ）	测定管	对照管
样本	10	
试剂一	50	50

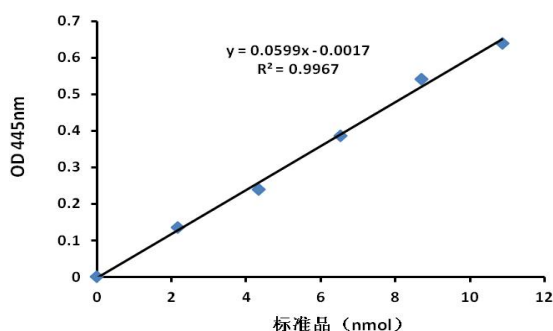
试剂二	20	20
混匀，于 30℃ 孵育 30min		
试剂三	20	20
样本		10
混匀，于 30℃ 孵育 10min		
试剂四	150	150
混匀，25℃ 孵育 5min，立即于 445nm 处读取吸光值 A（15min 内完成检测）， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

【注】1.若 A 测定超过 1.8，可降低样本量 V1（如 5 μ L，另外 5 μ L 用蒸馏水补齐，总体积 10 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 30 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： $y = 0.0599x - 0.0017$ ，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。

$$ICL(\text{nmol/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0017) \div 0.0599] \div (V1 \times Cpr) \div T = 3338.9 \times (\Delta A + 0.0017) \div Cpr$$

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。

$$ICL(\text{nmol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0022) \div 0.0599] \div (W \times V1 \div V) \div T = 3338.9 \times (\Delta A + 0.0017) \div W$$

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。

$$ICL(\text{nmol/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0022) \div 0.0599] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 6.68 \times (\Delta A + 0.0017)$$

V---加入提取液体积，1 mL； V1---加入样本体积，0.01mL； 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, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1mg/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。