



微信公众号

## 异柠檬酸裂解酶活性检测试剂盒

### ICL Assay Kit

**微量法**
**产品编号：AK465M**
**产品规格：100T/96S**
**产品组成及保存条件：**

编号	规格	储存条件
ES465	100mL×1 瓶	4°C保存；
AK465-A	15mL×1 瓶	4°C保存；
AK465-B	粉剂×1 瓶	-20°C保存；
AK465-C	360μL×1 支	4°C保存；
AK465-D	粉剂×1 瓶	4°C保存；

**※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。**
**简介：**

**意义：**异柠檬酸裂解酶 (isocitrate lyase, 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。

**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。

**自备用品：**

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

**样品处理：**

- 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）：ES465 体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL ES465），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°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 组织：按照组织质量（g）：ES465 体积(mL)为 1: 5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL ES465），进行冰浴匀浆。15000g 4°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。

**测定步骤：**

- 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。
- 样本测定
  - 工作液的配置，将 AK465-B 和 AK465-C 转移至 AK465-A 中，充分混合溶解，置于 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）水浴 5min；用不完的试剂分装后-20°C 保存，禁止反复冻融；
  - 在 AK465-D 中加入 4mL 蒸馏水，充分溶解待用；用不完的试剂分装后-20°C 保存，禁止反复冻融；
  - 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入下列试剂。

试剂名称	测定管 (μL)
样本	10
工作液	150
AK465-D	40

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 酶活性计算公式：**

- 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 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$ICL (U/mg prot) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$ICL (U/g 鲜重) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{总}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div W$$

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。

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

注：V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  L / mol / cm；d：比色皿光径，1cm；

V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 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。

$$ICL (U/mg prot) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 3216 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$ICL (U/g 鲜重) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{总}}) \div T = 3216 \times \Delta A \div W$$

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。

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

注：V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  L / mol / cm；d：96 孔板光径，0.5cm；

V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 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。

**注意事项：**

1. 测定过程中样本和所有试剂在冰上放置，以免变性和失活。

2. 石英比色皿中反应液的温度必须保持 37°C 或 25°C，取小烧杯一只装入一定量的 37°C 或 25°C 蒸馏水，将此烧杯放入 37°C 或 25°C 水浴锅中，在反应过程中把石英比色皿连同反应液放在此烧杯中。