



异柠檬酸裂解酶活性检测试剂盒

ICL Assay Kit

紫外分光光度法

产品编号: AK465U

产品规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES465	50mL×1 瓶	4℃保存；
AK465-A	15mL×1 瓶	4℃保存；
AK465-B	15mL×1 瓶	4℃保存；
AK465-C	粉剂×3 瓶	-20℃保存；临用前每瓶加入5mL蒸馏水，充分混匀待用； 剩余试剂仍-20℃保存；
AK465-D	粉剂×3 瓶	-20℃保存；临用前每瓶加入5mL蒸馏水，充分混匀待用； 剩余试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
AK465-E	800μL×2 支	4℃保存；临用前每支加入560μL蒸馏水，充分混匀待用； 剩余试剂仍4℃保存；
AK465-F	粉剂×3 瓶	4℃保存；临用前每瓶加入5mL蒸馏水，充分混匀待用。 剩余试剂-20℃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、1mL 石英比色皿、台式离心机、水浴锅、移液器、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℃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℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤:

- 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- 样本测定

试剂名称	测定管 (μL)
AK465-A	300
AK465-B	250
AK465-C	300
AK465-D	300

AK465-E	20
样本	50
混匀, 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴 5min	
AK465-F	300
将上述试剂按顺序加入 1 mL 玻璃比色皿中, 加 AK465-F 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 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。	
注意: 若一次性测定样本较多, 可将 AK465-A, B, C, D, E, 和样本按比例配成混合液, 在 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴 5min 以上, 测定时加入 1220μL 混合液和 300μL AK465-F 测定。	

ICL 酶活性计算公式:

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。

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

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。

$$ICL (\text{U/g 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{总}}) \div T = 2443 \times \Delta A \div W$$

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。

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

注: 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 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:

- 测定过程中样本和所有试剂在冰上放置, 以免变性和失活。
- 1mL 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 1mL 石英比色皿连同反应液放在此烧杯中。