



异柠檬酸裂解酶(ICL)试剂盒-显色法

可见分光光度法

货号: R45042-48S

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, 进而计算得出ICL 活性。

该酶催化反应: $\text{isocitrate} = \text{succinate} + \text{glyoxylate}$ 。

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60mL×1瓶	4℃保存	
试剂一	液体25mL×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7mL试剂一溶解备用;
试剂三	液体6mL×1瓶	4℃保存	
试剂四	液体45mL×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

所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径1cm)、低温台式离心机、可调式移液器、恒温水浴锅、研钵、冰和蒸馏水。

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可见分光光度计预热30min以上, 调节波长至445nm, 蒸馏水调零。

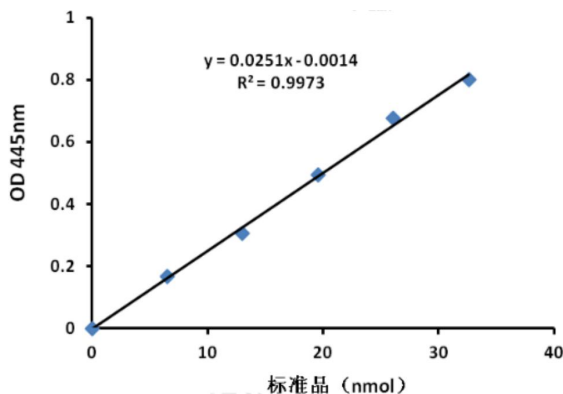
②所有试剂解冻至室温。在EP管中依次加入:

试剂名称(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)。		



结果计算:

1、标准曲线方程: $y=0.0251x-0.0014$, 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。

$$\begin{aligned} \text{ICL}(\text{nmol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0014) \div 0.0251] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 2656 \times (\Delta A + 0.0014) \div Cpr \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{ICL}(\text{nmol/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0014) \div 0.0251] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 2656 \times (\Delta A + 0.0014) \div W \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{ICL}(\text{nmol/h}/10^4 \text{cell}) &= [(\Delta A + 0.0014) \div 0.0251] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 5.3 \times (\Delta A + 0.0014) \end{aligned}$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1--- 加入样本体积, 0.03mL;

标准品Mr---92.05;



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: 3008007435@qq.com

T---反应时间, 30min=0.5h;

W--- 样本质量, g;

50--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: 0,0.03,0.06,0.09,0.12,0.15mg/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。



源叶