

鸟氨酸转氨酶(nithine- δ -aminotransferase , δ -OAT)试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义

脯氨酸是植物体内适应逆境胁迫的一种重要的渗透调节物质。高等植物中脯氨酸代谢因其初始底物不同，分为谷氨酸(Glu)和鸟氨酸(Orn)两条合成途径。鸟氨酸转氨酶(δ -OAT)是以鸟氨酸为前体合成脯氨酸途径的关键酶，对植物适应逆境胁迫起关键作用。

测定原理

鸟氨酸和 α -酮戊二酸在鸟氨酸转氨酶和 NADH 作用下发生氨基转移反应生成吡咯啉-5-羧酸(P5C)，同时产生 NAD，通过检测 340nm 处的吸光度的变化可反映出鸟氨酸转氨酶活性的高低。

自备实验用品及仪器

天平、低温离心机、研钵、酶标仪、96 孔板。

试剂组成和配制

提取液：液体 110mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 30 mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；临用前加 8mL 试剂一充分溶解；用不完的试剂 4℃ 保存。

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；临用前加 8mL 试剂一充分溶解；用不完的试剂 4℃ 保存。

试剂四：粉剂×2 瓶，-20℃ 保存；临用前每瓶加 4mL 试剂一充分溶解；现配现用。

酶液提取

1. 组织：按照质量(g)：提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例(建议称取约 0.1g，加入 1mL 提取液)加入提取液，冰浴匀浆后于 4℃，10000g 离心 10min，取上清置冰上待测。
2. 细胞：按照细胞数量(10^4 个)：提取液体积(mL)为 500~1000: 1 的比例(建议 500 万细胞加入 1mL 提取液)，冰浴超声波破碎细胞(功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min)；然后 4℃，10000g 离心 10min，取上清置冰上待测。
3. 液体：直接检测。

测定操作

1. 酶标仪预热 30min，调节波长至 340nm。
2. 将配好的试剂二、三、四 37℃ 预热 5min。(注意：粉剂试剂需要自行配制)
3. 取 96 孔板，依次加入 60 μ L 试剂二，60 μ L 试剂三，60 μ L 试剂四，20 μ L 粗酶液，充分混匀，记录 340nm 处初始吸光值和 37℃ 反应 10min 的吸光值 A2， $\Delta A=A1-A2$ 。

4. 计算公式

用 96 孔板测定的计算公式如下

(1) 按照样本蛋白浓度计算

酶活单位定义：每毫克组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\delta\text{-OAT (nmol/min /mg prot)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times C_{pr}) \div T \\ &= 321.54 \times \Delta A \div C_{pr}\end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算

酶活单位定义：每克组织每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\delta\text{-OAT (nmol/min /g 鲜重)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 321.54 \times \Delta A \div W\end{aligned}$$

(3) 按照细胞数量计算

酶活单位定义：每 10^4 个细胞每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\delta\text{-OAT (nmol/min/}10^4\text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 321.54 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

(4) 按照液体体积计算

酶活单位定义：每毫升液体每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\delta\text{-OAT (nmol/min/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ = 321.54 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.2mL； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm； d ：96 孔板光径，0.5cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.02mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； T ：反应时间，10 min； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样本质量，g