

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°C保存。

试剂一：液体30 mL×1瓶，4°C保存。

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

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

试剂四：粉剂×2瓶，-20°C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°C，10000g离心10min，取上清置冰上待测。
2. 细胞：按照细胞数量(10⁴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°C，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°C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°C反应10min的吸光值A₂， $\Delta A=A_1-A_2$ 。
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。

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

$$= 321.54 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

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

$$= 321.54 \times \Delta A \div W$$

(3) 按照细胞数量计算

酶活单位定义：每104个细胞每分钟消耗1 nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\delta\text{-OAT (nmol/min /104 cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 321.54 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

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