

鸟氨酸转氨酶(δ -OAT)检测试剂盒（微量法）

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。

试剂组成和配制：

提取液：液体 110mL \times 1 瓶，4 $^{\circ}$ C 保存。

试剂一：液体 30 mL \times 1 瓶，4 $^{\circ}$ C 保存。

试剂二：粉剂 \times 1 瓶，4 $^{\circ}$ C 保存；临用前加 8mL 试剂一充分溶解；用不完的试剂 4 $^{\circ}$ C 保存。

试剂三：粉剂 \times 1 瓶，4 $^{\circ}$ C 保存；临用前加 8mL 试剂一充分溶解；用不完的试剂 4 $^{\circ}$ C 保存。

试剂四：粉剂 \times 2 瓶，-20 $^{\circ}$ 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：

- 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 $^{\circ}$ C，10000g 离心 10min，取上清置冰上待测。
- 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 $^{\circ}$ C，10000g 离心 10min，取上清置冰上待测。
- 液体：**直接检测。

测定步骤：

- 酶标仪预热 30min，调节波长至 340nm。
- 将配好的试剂二、三、四 37 $^{\circ}$ C 预热 5min。（注意：粉剂试剂需要自行配制）
- 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 $^{\circ}$ C 反应 10min 的吸光值 A2， $\Delta A=A1-A2$ 。

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。

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

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

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

(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。

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

V 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 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