

## 鸟氨酸转氨酶（OAT）检测试剂盒（分光光度法）

**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( $\delta$ -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 $\alpha$ -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 55mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 70 mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；临用前加 20mL 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 20mL 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 10mL 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℃，10000g 离心 10min，取上清置冰上待测。
- 细胞：按照细胞数量 (10<sup>4</sup> 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。
- 液体：直接检测。**

## 测定步骤:

1. 分光光度计预热 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 1mL 石英比色皿, 依次加入 300 $\mu$ L 试剂二, 300 $\mu$ L 试剂三, 300 $\mu$ L 试剂四, 100 $\mu$ 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,  $\Delta A=A1-A2$ 。

## 计算公式:

(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。

$$\begin{aligned}\delta\text{-OAT (nmol/min /mg prot)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 160.77 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned}\delta\text{-OAT (nmol/min /g 鲜重)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 160.77 \times \Delta A \div W\end{aligned}$$

(3) 按照细胞数量计算

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

$$\begin{aligned}\delta\text{-OAT (nmol/min /10}^4\text{ cell)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 160.77 \times \Delta A \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned}\delta\text{-OAT (nmol/min /mL)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 160.77 \times \Delta A\end{aligned}$$

V 反总: 反应体系总体积, 1mL;

$\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数, 6.22 $\times 10^3$  L / mol /cm;

d: 比色皿光径, 1cm;

V 样: 加入样本体积, 0.1mL;

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