

鸟氨酸转氨酶 (OAT) 测定试剂盒说明书

(货号: G1107W 微板法 96 样)

一、产品简介:

鸟氨酸转氨酶 (OAT, EC 2.6.1.13) 是以鸟氨酸为前体合成脯氨酸的关键酶, 对植物适应逆境胁迫起关键作用

鸟氨酸转氨酶 (OAT) 在底物鸟氨酸和 α -酮戊二酸存在下, 使鸟氨酸脱氨并伴随着 NADH 的氧化, 通过检测 NADH 在 340nm 处吸光值的下降量, 即可计算出鸟氨酸转氨酶的酶活性大小。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉体 mg×3 支	4℃ 保存	临用前甩几下, 使粉体落到底部, 再加入 0.5mL 蒸馏水溶解备用, 用不完的试剂分装后-20℃ 保存, 禁反复冻融, 三天内用完。
试剂二	粉体 mg×1 瓶	4℃ 保存	临用前甩几下, 使粉体落到底部, 再加入 5mL 蒸馏水溶解备用
试剂三	液体 14mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	粉体 mg×1 瓶	4℃ 保存	临用前甩几下, 使粉体落到底部, 再加入 5mL 蒸馏水溶解备用

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、水浴锅、离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、鸟氨酸转氨酶 (OAT) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 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:

取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 冰浴匀浆, 12000rpm, 4℃ 离心 10min, 取上清液待用。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 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。

③ 液体样本: 澄清的液体样本直接检测, 若浑浊则离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm。

② 所有试剂解冻至室温。

③ 在 96 孔板依次加入:

试剂名称 (μ L)	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	20

试剂三	130
室温 (25°C) 放置 5min	
试剂四	20
混匀, 立即于 340nm 处检测, 10s 时读取 A1, 15min 后读取 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。	

【注】1. 若 ΔA 的值在零附近, 可以适当延长反应时间到 30min 后或更长读取 A2, 改变后的反应时间需代入计算公式重新计算。或适当加大样本量, 则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。

2. 若起始值 A1 太大如超过 2 (如颜色较深的植物叶片, 一般色素较高, 则起始值相对会偏高), 可以适当减少样本加样量, 则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。

或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm, 4°C 离心 10min, 上清液用于检测;

3. 若下降趋势不稳定, 可以每隔 20S 读取一次吸光值, 选取一段线性下降的时间段来参与计算, 相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每毫克组织蛋白每分钟内氧化 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{OAT 活力 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ = 214.4 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算:

单位定义: 每克组织每分钟内氧化 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{OAT 活力 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ = 214.4 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌/细胞数量计算:

单位定义: 每 10^4 个细胞每分钟内氧化 1 nmol NADH 定义为一个酶活单位 (U)。

$$\text{OAT 活力 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.43 \times \Delta A$$

4、液体中 OAT 活力的计算:

单位定义: 每毫升液体每分钟内氧化 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{OAT 活力 (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T \\ = 214.4 \times \Delta A$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.02mL;

V2---反应体系总体积, 2×10^{-4} L;

d---96 孔板光径, 0.5cm;

ϵ ---NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol / cm;

W---样本质量, g;

500---细菌或细胞数量;

T---反应时间, 15min;

Cpr---蛋白浓度 (mg/mL), 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。