

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

微量法 100T/96S

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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 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。

组成：

产品名称	AC022-100T/96S	Storage
提取液：液体	110ml	4℃
试剂一：液体	30ml	4℃
试剂二：粉剂	1 瓶	4℃
试剂三：粉剂	1 瓶	4℃
试剂四：粉剂	2 瓶	-20℃
说明书	1 份	

试剂二临用前加 8ml 试剂一充分溶解；用不完的试剂 4℃ 保存。

试剂三临用前加 8ml 试剂一充分溶解；用不完的试剂 4℃ 保存。

试剂四临用前每瓶加 4ml 试剂一充分溶解；现配现用。

自备仪器和用品：

天平、低温离心机、研钵、酶标仪、96 孔板。

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。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司

江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号



服务热线：0518-81263339

官网：<http://www.bio149.com>

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, $\Delta A=A_1-A_2$ 。

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。

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

(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。

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

(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。

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

(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。

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

V 反总: 反应体系总体积, 0.2ml; ε : NADH 摩尔消光系数, 6.22 $\times 10^3$ 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

