

## 鸟氨酸转氨酶(nithine- $\delta$ -aminotransferase , $\delta$ -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(  $\delta$  -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  $\alpha$  -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。

### 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℃ 保存。

试剂一：液体 30 mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；临用前加 8mL 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 8mL 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 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℃，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。

### 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℃ 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 $\mu$ L 试剂二，60 $\mu$ L 试剂三，60 $\mu$ L 试剂四，20 $\mu$ L 粗酶液，充分混匀，记录 340nm 处初始吸光值和 37℃ 反应 10min 的吸光值 A2， $\Delta A=A1-A2$ 。
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。

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

(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 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。

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

(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； $\epsilon$ ：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