

鸟氨酸脱羧酶(Ornithine decarboxylase, ODC)活性检测说明书

(货号: BP10075F 紫外法 24 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

鸟氨酸脱羧酶(ODC, EC 4.1.1.17)是多数植物体内催化游离态多胺合成的关键酶, 与植物逆境生理有一定关系。

鸟氨酸脱羧酶(ODC)催化底物鸟氨酸生成产物腐胺, 通过衍生剂使产物腐胺衍生化, 该衍生物在 254nm 处有最大吸收峰。通过检测 254nm 处吸光值变化得出 ODC 酶活大小。

二、试剂盒组成和配置:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 1.5mL×1 支	4℃保存	
试剂三	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体 0.3mL×1 支	4℃避光保存	
试剂六	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	液体 1mL×1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、乙醇、乙酸乙酯、甲醇、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 称取约 0.2g 组织, 加入 1mL 经预冷的 95%乙醇冰浴匀浆, 4℃放置 10min; 12000rpm, 4℃离心 5min; 弃上清, 留沉淀, 向沉淀中加入经预冷的 80%乙醇混匀, 4℃放置 10min; 12000rpm, 4℃离心 5min; 弃上清, 留沉淀。再向沉淀中加入 1mL 经预冷提取液, 涡旋混匀, 4℃放置 10min; 12000rpm, 4℃离心 5min; 留上清, 弃沉淀。上清液置冰上待测。

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 经预冷的 95%乙醇冰浴匀浆, 4℃放置 10min; 12000rpm, 4℃离心 5min; 弃上清, 留沉淀, 向沉淀中加入经预冷的 80%乙醇混匀, 4℃放置 10min; 12000rpm, 4℃离心 5min; 弃上清, 留沉淀。再向沉淀中加入 1mL 经预冷提取液, 涡旋混匀, 4℃放置 10min; 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。上清液置冰上待测。

【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: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、检测步骤:

① 紫外分光光度计调至 254nm (等待仪器过自检程序亦可)。试剂一和二可于 37℃孵育 5min。在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	150	150
试剂一	300	300
混匀, 于 37°C条件下孵育 5min		
试剂二	50	
蒸馏水		50
混匀, 于 37°C条件下孵育 1 小时。		
试剂三	100	100
混匀, (若浑浊则于 8000g 条件下室温离心 10min), 上清液待检测。		

② 在 EP 管中依次加入:

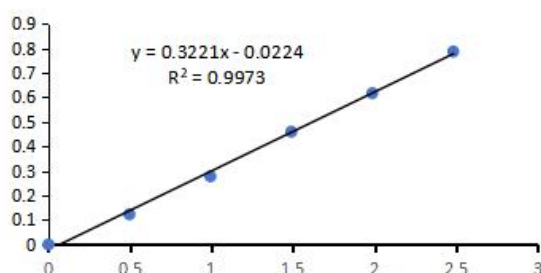
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
上清液	300	300
试剂四	300	300
试剂五	6	6
快速手动或涡旋仪混匀 20 秒, 于 40°C条件下孵育 50min(期间振荡混匀 3-5 次, 每次 30 秒)。		
试剂六	600	600
上下颠倒混匀约 1 分钟。		
乙酸乙酯	700	700
上下颠倒混匀约 1 分钟后 (试剂最好上下充分混匀好几次), 12000rpm 室温离心 3min 使试剂上下分层, 取出 0.5mL 上层液体至 EP 管中, 接着用氮吹仪吹干, 最后向沉淀中加入 750μL 甲醇使沉淀完全溶解 (可用涡旋振荡仪或超声仪), 最后取出全部澄清液体至 1mL 石英比色皿 (光径 1cm) 中于 254nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。		

【注】1.若 $A > 1.8$, 可对最后一步甲醇溶解液体再用甲醇稀释后测定, 则稀释倍数 D 带入公式计算。

2. $\Delta A < 0.01$, 则可加大样本取样 W; 或增加加样体积 V1 (由 150μL 增至 300μL 或更多, 则试剂一相应减少); 或延长孵育时间 T (由 1 小时增至 2 小时), 则改变后的 W 和 V1 和 T 需带入公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 0.3221x - 0.0224$; x 是标准品摩尔浓度 (μmol/mL), y 是 ΔA 。



1、按样本质量计算:

酶活定义：每克组织每小时催化 1 μ mol 鸟氨酸生成腐胺定义为一个酶活单位。

$$\text{ODC}(\mu\text{mol/h/g 鲜重})=[(\Delta A+0.0224)\div 0.3221\times 0.6]\div (W\times V1\div V)\div T\times D$$

$$=12.42\times (\Delta A+0.0224)\div W\times D$$

2、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每小时催化 1 μ mol 鸟氨酸生成腐胺定义为一个酶活单位。

$$\text{ODC}(\mu\text{mol/h/mg prot})=[(\Delta A+0.0224)\div 0.3221\times 0.6]\div (Cpr\times V1\div V)\div T\times D$$

$$=12.42\times (\Delta A+0.0224)\div Cpr\times D$$

3、按液体体积计算：

酶活定义：每克组织每小时催化 1 μ mol 鸟氨酸生成腐胺定义为一个酶活单位。

$$\text{ODC}(\mu\text{mol/h/mL})=[(\Delta A+0.0224)\div 0.3221\times 0.6]\div V1\div T\times D$$

$$=12.42\times (\Delta A+0.0224)\times D$$

4、按细菌或细胞数量计算：

酶活定义：每克组织每小时催化 1 μ mol 鸟氨酸生成腐胺定义为一个酶活单位。

$$\text{ODC}(\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell})=[(\Delta A+0.0224)\div 0.3221\times 0.6]\div (500\times V1\div V)\div T\times D$$

$$=12.42\times (\Delta A+0.0224)\div 500\times D$$

V---加入提取液体积，1mL；

V1---样本加入体积，0.15mL；

W---样本质量，g； T---反应时间，1 小时；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

0.6---第①步中反应总体积，mL；

标准品分子量--- 161.07；

500---细菌或细胞总数，万

Cpr---样本蛋白浓度，mg/mL； 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 标准品母液浓度为 2mg/mL。将母液用甲醇稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0，0.04，0.08，0.12，0.16，0.2 mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 3 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 200uL，加入 1.8ml 甲醇，混匀得到 0.2mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.04	0.08	0.12	0.16	0.2
标品稀释液 uL	0	80	160	240	320	400
甲醇 uL	400	320	240	160	80	0
各标准管混匀待用。						

- 4 依据②步测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂组分 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	300	
甲醇		300
试剂四	300	300
试剂五	6	6

快速手动或涡旋仪混匀 20 秒，于 40℃条件下孵育 50min(期间振荡混匀 3-5 次，每次 30 秒)。		
试剂六	600	600
上下颠倒混匀约 1 分钟。		
乙酸乙酯	700	700
上下颠倒混匀约 1 分钟后（试剂最好上下充分混匀好几次），12000rpm 室温离心 3min 使试剂上下分层，取出 0.5mL 上层液体至 EP 管中，接着用氮吹仪吹干，最后向沉淀中加入 400 μ L 甲醇使沉淀完全溶解（可用涡旋振荡仪或超声仪），最后取出全部澄清液体至 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中于 254nm 处读取吸光值 A， $\Delta A=A$ 标准 A0 浓度。		