

Octopine 脱氢酶 (ODH) 活性测定试剂盒说明书

(货号: BP10243W 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

海洋无脊椎动物主要存在 4 种无氧代谢途径, 其中葡萄糖-opine 途径在无氧代谢初期发挥了重要作用, 无脊椎动物中特有的 Opine 脱氢酶 (OpDHs) 保证了这一过程的顺利进行。Octopine 脱氢酶 (ODH; EC 1.5.1.11) 是 Opine 脱氢酶 (OpDHs) 系列酶中的一种。

Octopine 脱氢酶 (ODH) 催化丙酮酸和特异底物精氨酸反应生成相应的亚氨基酸, 同时使 NADH 发生氧化, 通过检测 NADH 在特征吸收波长 340nm 处的下降速率即可得出 ODH 酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 2 支	-20℃保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使粉剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 每支分别加 0.55mL 蒸馏水溶解备用; 3. 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融, 一周内用完。
试剂二	液体 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使粉剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 16mL ×1 瓶	4℃保存	

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)、96 孔板、离心管、酶标仪、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:

称取约 0.1g 组织样本, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【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、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm。

② 在 96 孔板中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	160
混匀, 室温 (25℃) 下, 于 340nm 读取吸光值 A1, 5min 后读取吸光值 A2,	

$$\Delta A = A1 - A2。$$

【注】 1.若 10s 后反应体系未稳定可延长到 1min 后再读取 A1 值。

2.若 ΔA 的值小于 0.005, 可以适当延长反应时 T (如由 5min 增至 10min 或更长) 读取 A2, 或适当加大样本量 V1 (如增至 40 μ L, 则试剂三相应减少), 则改变后的 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

3. 若起始值 A1 太大如超过 2 (如颜色较深的样本), 可以适当减少样本加样量 V1 (如减至 10 μ L, 则试剂三相应增加), 则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。

4. 若 ΔA 的值大于 0.35 或 A2 值低于 0.35, 则需减少反应时间 T (如减至 2min) 读取 A2, 则改变后的反应时间 T 需代入计算公式重新计算。

5. 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:

定义: 每毫克组织蛋白在每分钟内氧化 1 nmol NADH 所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{ODH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 643.1 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算:

定义: 每克组织在每分钟内氧化 1nmol NADH 所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{ODH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div W$$

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 $\times 10^{-4}$ L;

d---96 孔板光径, 0.5cm;

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

W---样本质量, g;

T---反应时间, 5min;

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。