

鸟氨酸转氨酶（OAT）测定试剂盒说明书

（货号：BP10428F 紫外法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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，即可计算得出鸟氨酸转氨酶的酶活性大小。

二、试剂配制：

盒组成和

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	粉体 3 支	4℃保存	每支： 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 0.75mL 蒸馏水溶解备用； 3. 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 1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 5mL 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 28mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉体 1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 5mL 蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

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 比色皿、离心管、紫外分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

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、样本提取：

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、检测步骤：

① 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温。

③ 在 1mL 石英比色皿中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管
样本	60
试剂一	30
试剂二	60
试剂三	490
室温 (25°C) 放置 5min	
试剂四	60
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。

$$\text{OAT 活力}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 125.1 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{OAT 活力}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 125.1 \times \Delta A \div W$$

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)。

$$\text{OAT 活力}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.25 \times \Delta A$$

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。

$$\text{OAT 活力}(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 125.1 \times \Delta A$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.06mL；

V2---反应体系总体积， 7×10^{-4} L；

d---光径，1cm；

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。