

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

(货号: G0156W 微板法 48 样)

一、产品简介:

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 3mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体 0.7mL×1 瓶	4℃保存	
试剂六	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	液体 1mL×1 支	4℃保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔 UV 板、可调式移液器、天平、低温离心机、水浴锅、乙醇、乙酸乙酯、甲醇。

四、鸟氨酸脱羧酶(ODC)活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

- ① 组织样本: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 1mL 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。上清液置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可按照组织质量(g):提取液体积(mL)为 2:5~10 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 500 万细菌或细胞加入 1mL 经预冷的 95%乙醇,冰浴超声波破碎细菌或细胞(冰浴,功率 20%或 200W,超声 3s,间隔 10s,重复 30 次); 12000rpm, 4℃离心 5min; 弃上清留沉淀,向沉淀中加入 1mL 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。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 个):提取液(mL)为 500~1000:1 比例进行提取。

2、上机检测:

- ① 酶标仪调节波长至 254nm。
- ② 试剂一和二可于 37℃孵育 5-15min。
- ③ 在 EP 管中依次加入:

试剂名称(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:

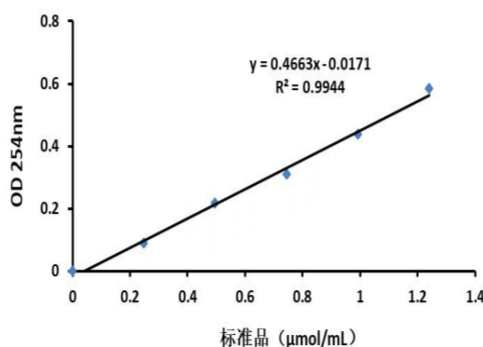
试剂名称(μL)	测定管	对照管
上清液	300	300
试剂四	300	300
试剂五	6	6
快速手动或涡旋仪混匀 20 秒, 于 40°C 条件下孵育 50min(期间振荡混匀 3-5 次, 每次 30 秒)。		
试剂六	600	600
上下颠倒混匀约 1 分钟。		
乙酸乙酯	700	700
上下颠倒混匀约 1 分钟后 (试剂最好上下充分混匀好几次), 12000rpm 室温离心 3min 使试剂上下分层, 取出 0.5mL 上层液体至 EP 管中, 接着用氮吹仪吹干, 最后向沉淀中加入 400μL 甲醇使沉淀完全溶解 (可用涡旋振荡仪或超声仪), 最后取出 200μL 液体至 96 孔 UV 板中于 254nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个对照)。		

【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: $y = 0.4663x - 0.0171$; x 是标准品摩尔浓度 (μmol/mL), y 是 ΔA 。



1、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。

$$\begin{aligned}\text{ODC}(\mu\text{mol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0171) \div 0.4663 \times 0.6] \div (\text{Cpr} \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 8.58 \times (\Delta A + 0.0171) \div \text{Cpr} \times D\end{aligned}$$

2、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。

$$\begin{aligned}\text{ODC}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0171) \div 0.4663 \times 0.6] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 8.58 \times (\Delta A + 0.0171) \div W \times D\end{aligned}$$

3、按细胞数量计算：

酶活定义：每 10⁴ 个细胞每小时催化 1 μ mol 鸟氨酸生成腐胺定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{ODC}(\mu\text{mol/h}/10^4\text{cell}) &= [(\Delta A + 0.0171) \div 0.4663 \times 0.6] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 8.58 \times (\Delta A + 0.0171) \div 500 \times D\end{aligned}$$

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---细胞数量，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 把标准品母液（2mg/mL）。依据第②步操作，甲醇复溶后再用甲醇稀释 10 倍后作为最高浓度母液，再用甲醇往下稀释 5 个浓度梯度，根据结果即可制作标准曲线。

