

Octopine 脱氢酶 (ODH) 活性测定试剂盒说明书

(货号: G0886F 紫外法 48 样)

一、产品简介:

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:

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|------|-------------|----------|--|
| 提取液 | 液体 60mL×1 瓶 | 4°C 保存 | |
| 试剂一 | 粉剂 mg×2 支 | -20°C 保存 | 使用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 每支分别加 0.55mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融, 一周内用完。 |
| 试剂二 | 液体 μL×1 支 | 4°C 保存 | 使用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。 |
| 试剂三 | 液体 32mL×1 瓶 | 4°C 保存 | |

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、Octopine 脱氢酶 (ODH) 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:

称取约 0.1g 组织样本, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm 4°C 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、上机检测:

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 在 1mL 石英比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

| 试剂名称 (μL) | 测定管 |
|---|-----|
| 样本 | 60 |
| 试剂一 | 20 |
| 试剂二 | 20 |
| 试剂三 | 600 |
| 混匀, 室温 (25°C) 下, 于 340nm 读取吸光值 A1, 5min 后读取吸光值 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。 | |

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。

$$\text{ODH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T = 375.13 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{ODH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 375.13 \times \Delta A \div W$$

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；

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。