

精氨酸脱羧酶(Arginine decarboxylase,ADC)活性检测说明书

(货号: ADS-W-QT019 微板法 48 样)

一、产品简介:

精氨酸脱羧酶(ADC, EC 4.1.1.19)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。

精氨酸脱羧酶(ADC)催化底物精氨酸生成产物胍丁胺,通过衍生剂使产物胍丁胺衍生化,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 ADC 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°C保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 3mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	液体 0.7mL×1 瓶	4°C保存	
试剂六	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	液体 1mL×1 支	4°C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、精氨酸脱羧酶(ADC)活性测定:

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、样本制备:

称取约 0.2g 组织,加入 1mL 经预冷的 95%乙醇冰浴匀浆,4°C放置 10min; 12000rpm, 4°C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°C放置 10min; 12000rpm, 4°C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°C放置 10min; 12000rpm, 4°C离心 5min; 留上清,弃沉淀。上清液置冰上待测。

2、上机检测:

① 酶标仪调节波长至 254nm。试剂一和二可于 37°C 孵育 5min。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:

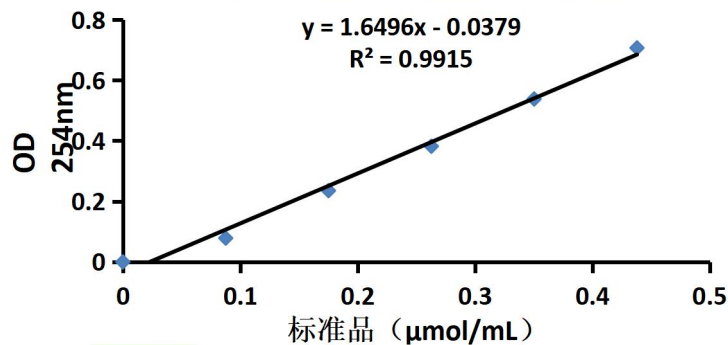
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
上清液	300	300
试剂四	300	300

试剂五	6	6
快速手动或涡旋仪混匀 20 秒，于 40℃ 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， $\Delta A = A \text{ 测定} - A \text{ 对照}$ 。		

- 【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. $\Delta A < 0.01$ ，则可加大样本取样质量 W；或增加样本加样体积 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： $y = 1.6496x - 0.0379$ ；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 1μmol 精氨酸生成胍丁胺定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{ADC}(\mu\text{mol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0379) \div 1.6496 \times 0.6] \div (\text{Cpr} \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 2.43 \times (\Delta A + 0.0379) \div \text{Cpr} \times D \end{aligned}$$

2、按样本质量计算：

酶活定义：每克组织每小时催化 1μmol 精氨酸生成胍丁胺定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{ADC}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0379) \div 1.6496 \times 0.6] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 2.43 \times (\Delta A + 0.0379) \div W \times D \end{aligned}$$

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---228.27；

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 20 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。