

## 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 有效期: 3 个月)

### 一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
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 支	4℃避光保存	
试剂六	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	液体 1mL×1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲,则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

### 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(UV板)、离心管、酶标仪、乙醇、乙酸乙酯、甲醇、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:

①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; 留上清,弃沉淀。上清液置冰上待测。

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 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; 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。上清液置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可按照细菌/细胞数量( $10^4$ ):提取液(mL)为 500~1000:1 的比例进行提取。

③ 液体样本:直接检测;若浑浊,离心后取上清检测。

#### 2、检测步骤:

① 酶标仪调节波长至 254nm(等待仪器过自检程序亦可)。试剂一和二可于 37℃孵育 5min。在 EP 管

中依次加入：

试剂组分 (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：

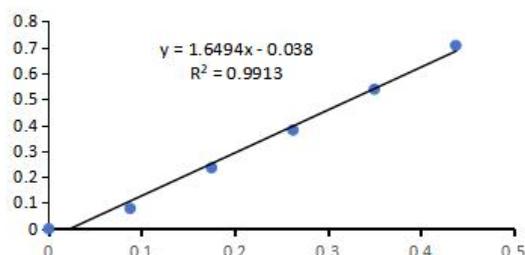
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
上清液	300	300
试剂四	300	300
试剂五	6	6
快速手动或涡旋仪混匀 20 秒，于 40°C 条件下孵育 50min(期间振荡混匀 3-5 次，每次 30 秒)。		
试剂六	600	600
上下颠倒混匀约 1 分钟。		
乙酸乙酯	700	700
上下颠倒混匀约 1 分钟后 (试剂最好上下充分混匀 好几次)，12000rpm 室温离心 3min 使试剂上下分 层，取出 0.5mL 上层液体至 EP 管中，接着用氮吹 仪吹干，最后向沉淀中加入 400μL 甲醇使沉淀完全 溶解 (可用涡旋振荡仪或超声仪)，最后取出 200μL 液体至 96 孔 UV 板中于 254nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定 - A 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： $y = 1.6494x - 0.038$ ；x 是标准品摩尔浓度 (μmol/mL)，y 是  $\Delta A$ 。



1.按样本质量计算：

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

$$\text{ADC}(\mu\text{mol/h/g 鲜重})=[(\Delta\text{A}+0.038)\div 1.6494\times 0.6]\div (\text{W}\times\text{V1}\div\text{V})\div\text{T}\times\text{D}$$

$$=2.43\times(\Delta\text{A}+0.038)\div\text{W}\times\text{D}$$

2、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 $\mu$ mol 精氨酸生成胍丁胺定义为一个酶活单位。

$$\text{ADC}(\mu\text{mol/h/mg prot})=[(\Delta\text{A}+0.038)\div 1.6494\times 0.6]\div (\text{Cpr}\times\text{V1}\div\text{V})\div\text{T}\times\text{D}$$

$$=2.43\times(\Delta\text{A}+0.038)\div\text{Cpr}\times\text{D}$$

3、按液体体积计算：

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

$$\text{ADC}(\mu\text{mol/h/mL})=[(\Delta\text{A}+0.038)\div 1.6494\times 0.6]\div\text{V1}\div\text{T}\times\text{D}$$

$$=2.43\times(\Delta\text{A}+0.038)\times\text{D}$$

4.按细菌或细胞数量计算：

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

$$\text{ADC}(\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell})=[(\Delta\text{A}+0.038)\div 1.6494\times 0.6]\div (500\times\text{V1}\div\text{V})\div\text{T}\times\text{D}$$

$$=2.43\times(\Delta\text{A}+0.038)\div 500\times\text{D}$$

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；

500---细菌或细胞总数， 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 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 标准品母液浓度为 2mg/mL。将母液用甲醇稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0， 0.02， 0.04， 0.06， 0.08， 0.1 mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 3 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 100 $\mu$ L， 加入 1.9ml 甲醇， 混匀得到 0.1mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
标品稀释液 $\mu$ L	0	80	160	240	320	400
甲醇 $\mu$ L	400	320	240	160	80	0
各标准管混匀待用。						

- 4 依据②步测定管的加样表操作， 根据结果， 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值， 过 0 点制作标准曲线。

试剂组分 ( $\mu$ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	300	
甲醇		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， $\Delta A=A$ 标准 A0 浓度。		