

多胺氧化酶（Polyamine oxidase, PAO）试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

多胺氧化酶是催化生物体内多胺氧化的关键酶，通过调节体内多胺水平和生成物的浓度，参与各种植物体对逆境胁迫的反应和生长发育过程。

测定原理：

PAO 催化多胺氧化产生过氧化氢，在过氧化物酶存在的条件下与底物显色，在 550nm 下有特征吸收峰，通过测定吸光值增加速率来反映 PAO 活性。

需自备的仪器和用品：

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 120mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：液体 3mL×1 瓶，4℃保存；

试剂三：液体 1.5mL×1 瓶，4℃保存；

试剂四：液体 1.5mL×1 瓶，4℃保存。

粗酶液提取：

1. 组织：按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）进行冰浴匀浆，然后 10000g，4℃离心 20min，取上清，置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（ 10^4 个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 10000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清等液体：直接测定。

测定步骤：

- 1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 550nm。
- 2、样本测定

| 试剂名称（ μ L） | 测定管 |
|----------------|-----|
| 试剂一 | 140 |
| 试剂二 | 20 |
| 试剂三 | 10 |
| 样本 | 20 |
| 试剂四 | 10 |

迅速混匀，于 550nm 下测定初始吸光值 A1 与 30min 后吸光值 A2。ΔA=A2-A1。

PAO 活性计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每 mg 组织蛋白在每 mL 反应体系中每分钟 A550 变化 0.001 为一个酶活力单位。

$$\text{PAO (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div 0.001 \div T = 333.33 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位定义：每 g 组织在每 mL 反应体系中每分钟 A550 变化 0.001 为一个酶活力单位。

$$\text{PAO (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.001 \div T = 333.33 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位定义：每 1 万个细菌或细胞在每 mL 反应体系中每分钟 A550 变化 0.001 为一个酶活力单位。

$$\text{PAO (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.001 \div T = 0.667 \times \Delta A$$

(4) 按液体体积计算

单位的定义：每 mL 液体样本在每 mL 反应体系中每分钟 A550 变化 0.001 为一个酶活力单位。

$$\text{PAO (U/mL)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div 0.001 \div T = 333.33 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，0.2mL；V 样：加入样本体积，0.02 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，30 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。