

多胺氧化酶 (Polyamine oxidase, PAO) 试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

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 (μL)	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。 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

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。

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

(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。