

## 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°C 保存;

试剂二: 液体 3mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂三: 液体 1.5mL×1 瓶, 4°C 保存;

试剂四: 液体 1.5mL×1 瓶, 4°C 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°C 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°C, 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。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。

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

(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。