

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：

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。

细菌、真菌：按照细胞数量（10⁴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。

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。

$$\text{PAO (U/104 cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.001 \div T = 0.667 \times \Delta A$$

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。