

单胺氧化酶（Monoamine Oxidase, MAO）试剂盒说明书

微量法100T/96S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

MAO(EC1.4.3.4) 主要存在于脊椎动物的各种器官，特别是分泌腺、脑、肝脏，在无脊椎动物、豆类的芽等植物中也存在催化单胺类物质代谢，含量较低，具有重要的生理功能，其活性能反映肝纤维化的程度。此外，MAO活性异常导致细胞内单胺类神经递质运转出现紊乱，从而引发多种病症。

测定原理：

MAO催化单胺类底物脱氨生成相应的醛，进一步氧化成酸；底物在360nm处有特征吸收峰，测定360nm光吸收下降的速率，计算MAO活性。

自备实验用品及仪器：

天平、低温离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板、蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液一：液体100mL×1瓶，4℃保存。

提取液二：液体100mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：液体120mL×1瓶，4℃保存。

试剂二：液体2mL×1管，4℃避光保存。

粗酶液提取：

1. 称取约0.1g样品，加1 mL预冷的提取液一充分冰浴匀浆，1000g，4℃，离心10min，弃沉淀；把上清转移到另一预冷的离心管，10000g，4℃，离心30min，弃上清；加入1mL预冷的提取液二，震荡混匀，16000g，4℃，离心40min，弃上清；沉淀加入预冷的1mL试剂一，震荡混匀，即粗酶液（可用于可溶性蛋白浓度测定）。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL提取液），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，弃沉淀；把上清转移到另一预冷的离心管，10000g，4℃，离心30min，弃上清；加入1.0 mL预冷的提取液二，震荡混匀，16000g，4℃，离心40min，弃上清；沉淀加入预冷的1.0 mL试剂一，震荡混匀，即粗酶液（可用于可溶性蛋白浓度测定），取上清置于冰上待测。
3. 血清：直接测定。

测定操作表：

1. 分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长至360nm。
2. 操作表

	对照管	测定管
酶液（ μL ）		20
试剂一（ μL ）	180	160
试剂二（ μL ）	20	20

混匀，于微量石英比色皿/96孔板，对照管调零，测定360nm处吸光值A1，然后37°C水浴60min，对照管调零，测定360nm处吸光值A2。ΔA=A1-A2

注意：空白管只需测定一次。

MAO活性计算公式：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、按蛋白含量计算

酶活定义：37°C，pH7.6时，每毫克蛋白质1min内转化1 nmol底物的酶量为一个酶活单位。

$$\text{DAO活性 (nmol/min / mg prot)} = \frac{\square}{\square} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 114 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本质量计算：

酶活定义：37°C，pH7.6时，每克样品1min内转化1 nmol底物的酶量为一个酶活单位。

$$\text{DAO活性 (nmol/min / g 鲜重)} = \frac{\square}{\square} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 114 \times \Delta A \div W$$

3、按照细胞数量计算

酶活定义：37°C，pH7.6时，每104个细胞1min内转化1 nmol底物的酶量为一个酶活单位。

$$\text{DAO活性 (nmol/min / 104 cell)} = \frac{\square}{\square} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T$$

$$= 114 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

4、按照液体体积计算

酶活定义：37°C，pH7.6时，每升血清1min内转化1 nmol底物的酶量为一个酶活单位。

$$\text{DAO活性 (nmol/min / L)} = \frac{\square}{\square} \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 114 \times \Delta A$$

ε：底物摩尔消光系数，1460L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V反总：反应总体积，0.2mL；V样：反应中样本体积，0.02mL；V样总：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；T：反应时间，60min；W：样本质量，g

a. 用96孔板测定的计算公式如下

1、按蛋白含量计算

酶活定义：37°C，pH7.6时，每毫克蛋白质1min内转化1 nmol底物的酶量为一个酶活单位。

$$\text{DAO活性 (nmol/min / mg prot)} = \frac{\square}{\square} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 228 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本质量计算：

酶活定义：37°C，pH7.6时，每克样品1min内转化1nmol底物的酶量为一个酶活单位。

$$\text{DAO活性 (nmol/min / g 鲜重)} = \frac{\square}{\square} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 228 \times \Delta A \div W$$

3、按照细胞数量计算

酶活定义：37°C，pH7.6时，每104个细胞1min内转化1nmol底物的酶量为一个酶活单位。

$$\text{DAO活性 (nmol/min / 104 cell)} = \frac{\square}{\square} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T$$
$$= 228 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

4. 按照液体体积计算

酶活定义：37°C，pH7.6时，每升血清1min内转化1nmol底物的酶量为一个酶活单位。

$$\text{DAO活性 (nmol/min / L)} = \frac{\square}{\square} \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 228000 \times \Delta A$$

ϵ : 底物摩尔消光系数, 1460L /mol /cm; d : 96孔板光径, 0.5cm; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.2mL; $V_{\text{样}}$: 反应中样本体积, 0.02mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL; T : 反应时间, 60min, W : 样本质量, g

注意事项:

- 1、吸光度变化应该控制在0.01~0.8之间。否则加大样品量或稀释样品，注意计算公式中参与计算的稀释倍数要相应改变。
- 2、样品蛋白质含量需要另外测定。