

多胺氧化酶 (Polyamine oxidases, PAO) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-YHKY010 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

多胺氧化酶 (PAO, EC 1.5.3.3) 广泛存在于动物、植物和微生物中。催化多胺氧化为醛, 其活性与核酸和蛋白合成密切相关。也与植物逆境生理有一定关系。

PAO 催化多胺产生醛和过氧化氢, 产物过氧化氢与 4-氨基氨替吡啶等反应产生一种有色物质, 其在 510nm 处有最大吸收峰。通过检测 510nm 处吸光值的变化量得出 PAO 酶活性大小。

二、试剂盒组成和配置:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 3mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	液体 13mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂 1 瓶	4℃避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 3mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织(水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量(g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞(冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量(10^4): 提取液(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min(等仪器过自检程序亦可), 调节波长至 510nm。

② 所有试剂解冻至室温(25℃), 在 96 孔板中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	30
试剂二	130
试剂三	20

混匀, 30℃下, 立即在 510nm 处读取吸光值 A1, 30min 后读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。

【注】若 ΔA 差值较小, 则需增加样本量 V1 (如增至 40 μ L, 则试剂二相应减少), 或延长反应时间 T (如增加至 1h 或更长), 则改变后的加样体积 V1 和反应时间 T 需加入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、按样本质量计算:

酶活定义: 每克组织每分钟在反应体系中使 510nm 处吸光值变化 0.01 为一个酶活单位。

$$\text{PAO 活性 } (\Delta \text{OD}_{510} / \text{min/g 鲜重}) = \Delta A \div (W \times V1 \div V) \div 0.01 \div T = 166.7 \times \Delta A \div W$$

2、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟在反应体系中使 510nm 处吸光值变化 0.01 为一个酶活单位。

$$\text{PAO } (\Delta \text{OD}_{510} / \text{min/mg prot}) = \Delta A \div (V1 \times \text{Cpr}) \div 0.01 \div T = 166.7 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

3、按液体体积计算

酶活定义: 每毫升液体每分钟在反应体系中使 510nm 处吸光值变化 0.01 为一个酶活单位。

$$\text{PAO 活性 } (\Delta \text{OD}_{510} / \text{min/mL}) = \Delta A \div V1 \div 0.01 \div T = 166.7 \times \Delta A$$

4、按细胞数量计算:

酶活定义: 每 10⁴ 个细胞每分钟在反应体系中使 510nm 处吸光值变化 0.01 为一个酶活单位。

$$\text{PAO 活性 } (\Delta \text{OD}_{510} / \text{min}/10^4 \text{cell}) = \Delta A \div (500 \times V1 \div V) \div 0.01 \div T = 0.34 \times \Delta A$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---反应中样本体积, 0.02mL;

W---样本质量, g;

T---反应时间, 30min;

500---细菌或细胞总数, 万。

Cpr---样本蛋白浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。