多胺氧化酶（Polyamine oxidases，PAO）试剂盒说明书

（货号：ADS-F-YHKY010　分光法 48 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-氨基氨替吡啉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 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 6mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	液体 26mL×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 5mL 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）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、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 可见分光光度计预热 30min（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 510nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。

③ 在 1mL 玻璃比色皿中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管
样本	60
试剂一	120

试剂二	520
试剂三	80
混匀，30℃下，立即在 510nm 处读取吸光值 A1，30min 后读取 A2，△A=A2-A1。	

【注】若△A 差值较小，则需增加样本量 V1（如增至 120μL，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 0.005 为一个酶活单位。

PAO 活性（△$\mathbf{OD_{510}}$/min/g 鲜重）=ΔA÷(W× V1÷V)÷0.005÷T=111.1×ΔA÷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 0.005 为一个酶活单位。

PAO（△$\mathbf{OD_{510}}$/min/mg prot）=ΔA÷(V1×Cpr)÷0.005÷T =111.1×ΔA÷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 0.005 为一个酶活单位。

PAO 活性（△$\mathbf{OD_{510}}$/min/mL）=ΔA÷V1÷0.005÷T=111.1×ΔA

4、按细胞数量计算：

酶活定义：每 10^4 个细胞每分钟在反应体系中使 510nm 处吸光值变化 0.005 为一个酶活单位。

PAO 活性（△$\mathbf{OD_{510}}$/min/10^4cell）=ΔA÷(500×V1÷V)÷0.005÷T=0.22×ΔA

V---加入提取液体积，1mL；　　V1---反应中样本体积，0.06mL；

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。