

单胺氧化酶（Monoamine Oxidase, MAO）试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

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、1 mL 玻璃比色皿、蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液一：液体 50mL×1 瓶，4℃保存。

提取液二：液体 50mL×1 瓶，4℃保存。

试剂一：液体 100mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：液体 5mL×1 瓶，4℃避光保存。

粗酶液提取：

1. 组织：按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液一）进行冰浴匀浆，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。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（ 10^4 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：

	空白管	测定管
酶液（ μL ）		100
试剂一（ μL ）	900	800

试剂二 (μL)	100	100
混匀, 1 mL 玻璃比色皿, 对照管调零, 测定 360nm 处吸光值 A ₁ , 然后 37°C 水浴 60min, 测定 360nm 处吸光值 A ₂ , ΔA= A ₁ - A ₂ 。		

注意: 空白管只需测定一次。

MAO 活性计算公式:

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 1nmol 底物的酶量为一个酶活单位。

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

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 1nmol 底物的酶量为一个酶活单位。

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

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 1nmol 底物的酶量为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{DAO 活性 (nmol/min / 10}^4 \text{ cell)} &= \frac{\Delta A}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T \\ &= 114 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min / L)} = \frac{\Delta A}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} = 114000 \times \Delta A$$

ε: 底物摩尔消光系数, 1.46 L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应总体积, 1mL; V 样: 反应中样本体积, 0.1mL; 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

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。