

## 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：

- 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）。
- 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。
- 血清：直接测定。

### 测定操作表：

- 分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长至 360nm。
- 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。

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

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 1 nmol 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 10<sup>4</sup> 个细胞 1min 内转化 1 nmol 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 1 nmol 底物的酶量为一个酶活单位。

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

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

**b. 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。

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

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。

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

3、按照细胞数量计算

酶活定义：37°C，pH7.6 时，每 10<sup>4</sup> 个细胞 1min 内转化 1nmol 底物的酶量为一个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{DAO 活性 (nmol/min / } 10^4 \text{ cell)} &= \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T \\ &= 228 \times \Delta A \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

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。

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

$\varepsilon$ ：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； $C_{\text{pr}}$ ：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。
-