（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-F093

产品规格：96T(40 samples)

检测仪器：荧光酶标仪(激发波长 535 nm，发射波长 587 nm)

Elabscience®单胺氧化酶（MAO）荧光法测试盒

Monoamine Oxidase (MAO) Activity Fluorometric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100
邮箱：biochemical@elabscience.cn
网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清(浆)、动物组织和细胞样本中的单胺氧化酶的总活力，也可特异性检测单胺氧化酶 A(MAO-A)和单胺氧化酶 B(MAO-B)的活力。

检测原理

单胺氧化酶(Monoamine Oxidase，MAO)，广泛存在于肝、肾、脑、小肠等器官细胞中的线粒体内，主要参与生物活性胺类物质的代谢灭活。MAO 根据对底物或抑制剂的结合特异性、细胞分布、免疫特异性等不同分为两个亚型，即 MAO-A 和 MAO-B。MAO 可催化对应的底物产生 H_2O_2，H_2O_2 进一步在酶的作用下与荧光探针形成红色络合物，测定单位时间内样本在激发波长 535 nm，发射波长 587 nm 处的荧光值变化，通过特异性抑制剂抑制，可分别检测和计算样本的 MAO-A 和 MAO-B 的活力。

本试剂盒检测动物组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extraction Solution)	50 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 (Buffer Solution)	40 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	抑制剂 A (Inhibitor A)	0.75 mL×1 支	-20°C 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	抑制剂 B (Inhibitor B)	0.75 mL×1 支	-20°C 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	加速剂 (Accelerant)	0.2 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	底物 (Substrate)	1.5 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂八 (Reagent 8)	探针 (Probe)	3 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂九 (Reagent 9)	8 mmol/L 标准品溶液 (8 mmol/L Standard Solution)	0.2 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔荧光酶标板	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：荧光酶标仪(激发波长：535 nm，发射波长：587 nm)、涡旋混匀仪

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至25°C。

② 试剂三工作液的配制：

按试剂三：试剂二=1:7的体积比配制（如配制1 mL试剂三工作液，取0.125 mL试剂三，用0.875 mL试剂二稀释混匀），未使用的溶液-20°C可保存1个月，2-8°C可避光保存1天。

③ 试剂四工作液的配制：

按试剂四：试剂二=1:7的体积比配制（如配制1 mL试剂四工作液，取0.125 mL试剂四，用0.875 mL试剂二稀释混匀），未使用的溶液-20°C可保存1个月，2-8°C可避光保存1天。

④ 试剂五工作液的配制：

取一支试剂五，加入1.25 mL试剂二溶解混匀，未使用的溶液2-8°C避光可保存7天。

⑤ 测定工作液的配制：

取一支5 mL EP管，加入1.9 mL试剂二、0.225 mL试剂五工作液、0.009 mL试剂六和0.126 mL试剂七，稀释混匀，配制成2.26 mL的测定工作液。测定工作液现配现用，半小时内使用完毕。

⑥ 80 μmol/L标准品溶液的配制：

取10 μL试剂九，加入990 μL双蒸水稀释混匀，未使用的溶液2-8°C避光可保存7天。

⑦ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μmol/L)	**0**	**16**	**32**	**40**	**48**	**56**	**64**	**80**
80 μmol/L 标准品溶液(μL)	0	40	80	100	120	140	160	200
双蒸水(μL)	200	160	120	100	80	60	40	0

样本准备

① 样本处理

血清(浆)样本：直接检测。

组织样本：按照组织质量(g)与试剂一体积(mL)=1：9的比例进行匀浆，4°C，10000 × g离心10 min，取上清液，置于冰上待测，当天检测有效。留取部分上清，进行蛋白浓度测定。

细胞样本：取1×10^6个细胞，加入200 μL试剂一匀浆，4°C，10000 × g离心10 min，取上清液，置于冰上待测，当天检测有效。留取部分上清，进行蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.003-2.67 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	2-3	小鼠血清	2-4
10%小鼠肝组织	2-4	10%小鼠肾组织	2-3
10%小鼠肺组织	2-3	10%小鼠心组织	2-3
10%小鼠脑组织	不稀释	10%虾仁组织	不稀释
1×10^6 个 CHO 细胞	不稀释	1×10^6 个 293T 细胞	不稀释

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

测定工作液临用前现配，半小时内使用完毕，否则背景值会随着放置时间延长而升高。

操作步骤

① 标准孔：取 10 μL 不同浓度的标准品溶液加入到相应的酶标孔中。
MAO-A 测定孔：取 10 μL 待测样本，加入到相应的酶标孔中。
MAO-B 测定孔：取 10 μL 待测样本，加入到相应的酶标孔中。
对照孔：取 10 μL 待测样本，加入到相应的酶标孔中。

② 向步骤①中标准孔和对照孔加入 40 μL 试剂二。
向步骤①中 MAO-A 测定孔加入 40 μL 试剂三工作液。
向步骤①中 MAO-B 测定孔加入 40 μL 试剂四工作液。

③ 25°C 静置 10 min。

④ 向步骤③中各孔加入 20 μL 试剂八。

⑤ 向步骤④中各孔加入 140 μL 测定工作液。

⑥ 振板 5 s，立即使用荧光酶标仪于激发波长 535 nm，发射波长 587 nm 检测各孔的荧光值 F_1。25°C 静置 30 min，使用荧光酶标仪于激发波长 535 nm，发射波长 587 nm 检测各孔的荧光值 F_2，标准曲线以标准孔 F_1 值进行拟合。

操作表

	标准孔	MAO-A 测定孔	MAO-B 测定孔	对照孔
不同浓度标准品溶液(μL)	10	--	--	--
待测样本(μL)	--	10	10	10
试剂二(μL)	40	--	--	40
试剂三工作液(μL)	--	40	--	--
试剂四工作液(μL)	--	--	40	--
室温(25°C)静置 10 min				
试剂八(μL)	20	20	20	20
测定工作液(μL)	140	140	140	140
振板 5 s，立即使用荧光酶标仪于激发波长 535 nm，发射波长 587 nm 检测各孔的荧光值 F_1。室温(25°C)静置 30 min，使用荧光酶标仪于激发波长 535 nm，发射波长 587 nm 检测各孔的荧光值 F_2，标准曲线以标准孔 F_1 值进行拟合。				

本试剂盒检测动物组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法（货号：E-BC-K318-M）。

结果计算

标准品拟合曲线：$y = ax + b$

① 血清（浆）样本中单胺氧化酶 A(MAO-A)和单胺氧化酶 B(MAO-B)酶活计算公式：

定义：25°C 条件下，每升血清(浆)在反应体系中每分钟生成 1 μmol 产物定义为一个酶活力单位。

$$\text{MAO-A/MAO-B 活力 (U/L)} = ((\Delta F_{\text{对照}} - \Delta F_{\text{MAO-A/MAO-B}}) - b) \div a \times f \div T$$

$$\text{总 MAO 活力} = \text{MAO-A} + \text{MAO-B}$$

② 动物组织或细胞样本中单胺氧化酶 A(MAO-A)和单胺氧化酶 B(MAO-B)酶活计算公式：

定义：25°C 条件下，每克组织或细胞蛋白在反应体系中每分钟生成 1 μmol 产物定义为一个酶活力单位。

$$\text{MAO-A/MAO-B 活力 (U/gprot)} = ((\Delta F_{\text{对照}} - \Delta F_{\text{MAO-A/MAO-B}}) - b) \div a \div C_{pr} \times f \div T$$

$$\text{总 MAO 活力} = \text{MAO-A} + \text{MAO-B}$$

注解：

y：标准品荧光值-空白荧光值(标准品浓度为 0 时的荧光值，标准曲线以标准孔 F_1 值进行拟合)

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

$\Delta F_{\text{对照}}$：对照孔的绝对荧光值（$\Delta F = F_2 - F_1$）

$\Delta F_{\text{MAO-A/MAO-B}}$：MAO-A/MAO-B 测定孔的绝对荧光值（$\Delta F = F_2 - F_1$）

C_{pr}：待测样本的蛋白浓度，gprot/L

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

T：反应时间，30 min

附录1 关键数据

1. 技术参数

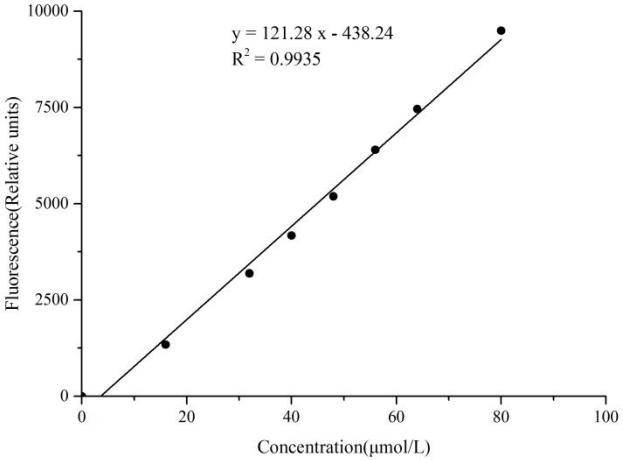
检测范围	0.003-2.67 U/L	批间差	3.4-10.3%
灵敏度	0.003 U/L	批内差	1.5-5.2%
稀释回收率	96-106%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量10 μL，按照操作步骤进行实验，荧光值如下表所示：

标准品浓度(μmol/L)	0	16	32	40	48	56	64	80
荧光值	238	1517	3407	4505	5492	6598	7727	9626
	200	1603	3407	4277	5327	6638	7624	9802
平均荧光值	219	1560	3407	4391	5410	6618	7675	9714
绝对荧光值	0	1341	3189	4172	5191	6399	7457	9495

② 绘制标曲(如下图)：



附录2 实例分析

例如检测人血清(数据仅供参考)：

取10 μL稀释2倍的人血清，按操作表操作，结果如下：

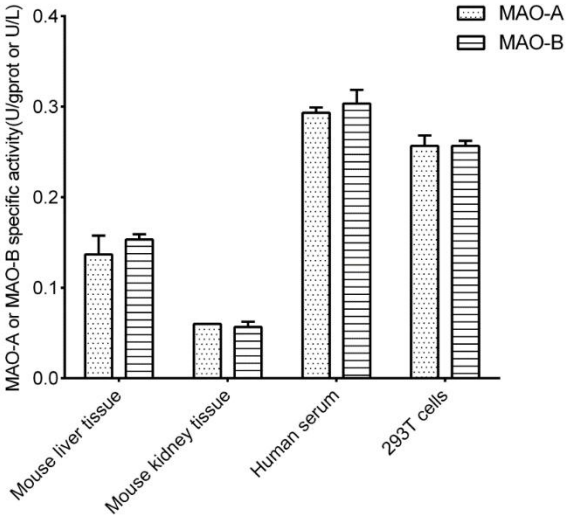
标准曲线：y = 121.28 x - 438.24，对照孔平均F_1值为197，对照孔平均F_2值为488，MAO-A测定孔平均F_1值为192，MAO-A测定孔平均F_2值为394，MAO-B测定孔平均F_1值为200，MAO-B测定孔平均F_2值为381，计算结果为：

$$\text{MAO-A活力(U/L)} = (488 - 197 - (394 - 192) + 438.24) \div 121.28 \times 2 \div 30 = 0.29\ \text{U/L}$$

$$\text{MAO-B活力(U/L)} = (488 - 197 - (381 - 200) + 438.24) \div 121.28 \times 2 \div 30 = 0.30\ \text{U/L}$$

$$\text{总MAO活力(U/L)} = 0.29 + 0.30 = 0.59\ \text{U/L}$$

按说明书操作，测定小鼠肝组织(10%组织匀浆蛋白浓度为7.90 gprot/L，稀释2倍，加样量10 μL)、小鼠肾组织(10%组织匀浆蛋白浓度为9.78 gprot/L，稀释2倍，加样量10 μL)、人血清(稀释2倍，加样量10 μL)、293T细胞(200 μL匀浆蛋白浓度为0.49 gprot/L，1×10^6个，加样量10 μL)的MAO-A和MAO-B活力(如下图)：



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。