天净沙系列

CAT#:EC1.4.3.2

低温运输，2-8℃保存

天净沙

L-氨基酸氧化酶活性测定试剂盒

L-Amino-Acid Oxidase Assay Kit

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品用于测定 L-氨基酸氧化酶（L-Amino-Acid Oxidase，L-AOD，CAS:9000-89-9，EC1.4.3.2）活性。其原理是 L-AOD 催化 L-氨基酸与水和氧气生成 2-含氧酸、氨气和过氧化氢，过氧化氢又在过氧化物酶催化下与邻联茴香胺反应生成氧化型邻联茴香胺和水，邻联茴香胺在 436 nm 处有特征光吸收，故通过监测吸光度在 436 nm 处随时间的降低，即可间接计算酶活性。本产品具有如下特点：

1. 即开即用，使用便捷，用户不需要优化条件，只需准备待测样本。
2. 提供 L-氨基酸氧化酶阳性对照，便于在遇到问题时分析原因。
3. 最低检测限为 0.18 U，线性范围在 0.25 U-0.71 U 之间。
4. 本试剂盒 1 个酶活性单位的定义是在 37℃ pH 7.5 的条件下，每分钟能催化 1 μmol 底物转化所需的酶量。由于 1 个 L-AOD 底物分子的转化将消耗 1 个邻联茴香胺分子故 1 个酶活性单位相当于在 37℃ pH 7.5 的条件下每分钟消耗 1 μmol 邻联茴香胺所需的酶量。
5. 本产品足够 100 次 1 mL 体系的比色皿检测或 400 次 250 μL 体系的 96 孔板检测。
6. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品使用小扁盒包装

成份	编号	规格	包装
L-AOD 活性测定底物干粉	EC1.4.3.2s	100 T	125 mL 本色瓶
L-AOD 活性测定反应液	EC1.4.3.2r	120 mL	125 mL 本色瓶
L-AOD 干粉	CAS:9000-89-9	5 T	0.5 mL 红盖管
L-AOD 储存液	5-C9000-89-9	110 μL	0.5 mL 本色管
过氧化物酶干粉	CAS:9003-99-0	100 T	1.5 mL 红盖管
过氧化物酶储存液	5-C9003-99-0	2 mL	2 mL 本色管
邻联茴香胺干粉	CAS:119-90-4	100 T	15 mL 本色瓶
使用手册	EC1.4.3.2sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，2-8℃保存，有效期一年。

自备物品

待测样本、样本缓冲液、分光光度计、1 mL 比色皿

使用方法

一、首次使用本试剂盒时配制下列溶液

1. 配制 L-AOD 活性测定底物液：将 100 mL L-AOD 活性测定反应液加入到装有 L-AOD 活性测定底物干粉的瓶中，颠倒摇晃 20 次溶解，得 L-AOD 活性

测定底物液，放冰上待用。

2. 配制 1 mM 邻联茴香胺溶液：将 10 mL L-AOD 活性测定反应液加入到装有邻联茴香胺干粉的瓶中，颠倒摇晃 20 次溶解，得 1 mM 邻联茴香胺溶液，放冰上待用。
3. 配制过氧化物酶液：将 1 mL 过氧化物酶储存液加入到装有过氧化物酶干粉的管中，颠倒摇晃 20 次，得过氧化物酶液，放冰上待用。
4. 如果一次实验没有用完上述溶液，需要放-20℃或更低温度保存。

二、待测样本的制备

5. 用自选方式制备待测样本，样本溶于缓冲液中，缓冲液 pH 值控制为 7.5。注意：由于芳香族酸酯、磺酸和硫酸胺之类的化合物会严重影响 L-AOD 活性，故样本中不得含有这些物质。同时，由于本试剂盒测定的是邻联茴香胺，故样本中也不得有邻联茴香胺的成分。
6. 预留 10 mL 最后溶解样本的样本溶解液，作为后续测光吸收时的阴性对照。
7. 用自备试剂测定待测样本的蛋白浓度，以备后续计算比活时使用。

三、标准曲线梯度稀释液的制备

8. 每次测量都应制作标准曲线，下面以 6 个稀释度的标准曲线为例。
9. 标记 1-6 个 2 mL 离心管，每个管中加入 1 mL 超纯水。
10. 将第 2 步制备的 1 mM 邻联茴香胺溶液为 1 号管样品。
11. 2 号管中加入 1 mL 在第 2 步制备的 1 mM 邻联茴香胺溶液，充分震荡 1 分钟，得 0.5 mM 邻联茴香胺溶液。放冰上待用。
12. 换枪头，在 3 号管中加入 1 mL 0.5 mM 邻联茴香胺溶液（上步稀释所得），充分震荡 1 分钟，得 250 μM 邻联茴香胺溶液。放冰上待用。
13. 重复上面的操作直到得到 1 mM、0.5 mM、250 μM、125 μM、62.5 μM、31.25 μM 共 6 个稀释度的样品。放冰上待用。

四、用光径 1 cm 的比色皿测定光吸收

14. 标记 N+7 个 1.5 mL 的塑料离心管，其中 N 个用于待测样品，1 个用于阴性对照，6 个用于标曲。
15. 按下表加入各成分：

成分	阴性对照	N 个样本管	6 个标曲管
各梯度的邻联茴香胺溶液	不加	不加	各 960 μL
L-AOD 活性测定底物液	960 μL	各 960 μL	不加
过氧化物酶液	20 μL	20 μL	20 μL

涡旋振荡 30 秒混匀，迅速加入下列成份后开始计时			
自备样本溶解液	20 μL	不加	20 μL
N 个自备待测样本	不加	各 20 μL	不加
总体积	1 mL	1 mL	1 mL
混合均匀 37℃保温 30 min			

16. 冷却到室温后迅速用分光光度计在 436 nm 测定 OD，测前用蒸馏水调零。

五、数据分析

17. 计算真实 OD436 光吸收：每个样本测得的光吸收减去阴性对照的光吸收即为每个样本的光吸收。共 N+6 个读数

18. 制备标准曲线：以邻联茴香胺溶液的浓度为横轴，以其真实 OD436 光吸收为纵轴，绘制标准曲线。

19. 根据计算公式，用 N 个样本的 OD436 数据计算出其所对应的邻联茴香胺浓度。根据 L-AOD 活性的定义（每分钟消耗 1 μmol 邻联茴香胺所需要的酶量为 1 个单位）计算出酶的活性。

20. 计算样本的酶比活性:样本总体积乘以酶浓度 U/mL 即得样本总酶单位数 U，样本总体积乘以其蛋白浓度即得样本总蛋白量（以 mg 为单位），样本酶比活（U/mg）=总酶单位数/总蛋白量。

六、96 孔板检测

21. 操作同上，只是在设置反应时，各成分的用量降低 75%，只用 25%。同时光径不是 1 cm，要根据所用 96 孔板修改（需要咨询厂家）。

七、阳性对照

22. 本试剂盒提供足够 5 次检测的 L-AOD 阳性对照。在遇到问题时可以用于查找原因。使用时需要加入 100 μL L-AOD 储存液，颠倒 20 次混匀，取 20 μL 按上面的操作步骤进行检测。提供的阳性对照的比活是 0.5 U/mg。

关联产品	D-氨基酸 N-乙酰转移酶活性测定试剂盒