

二胺氧化酶(DAO)活性检测试剂盒说明书

Diamine Oxidase Assay Kit

可见分光光度法

货号: AK066

规格: 50T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES10	80ml×1	4℃保存
AK066-A	0.5ml×1	4℃保存
AK066-B	粉剂×1	4℃保存; 临用前加入 5ml 蒸馏水溶解, 4℃可保存一个月
AK066-C	5ml×1	4℃保存

简介:

意义: 二胺氧化酶 (Diamine Oxidase, DAO; EC1.4.3.6) 广泛存在于动物 (肠粘膜、肺、肝脏、肾脏等)、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, 能够反映肠道机械屏障的完整性和受损程度。

原理: DAO 催化尸胺产生醛和过氧化氢, 外源添加过量的辣根过氧化物酶, 催化过氧化氢氧化邻联茴香胺生成氧化型邻联茴香胺, 在 460nm 处有特征吸收峰, 通过测定该波长吸光度增加速率, 计算 DAO 活性。

自备用品:

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1ml 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

粗酶液提取:

- 组织: 按照组织质量 (g):
组织: 按照组织质量 (g): 提取液 ES10 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 ES10) 进行冰浴匀浆, 然后 10000g, 4℃离心 20min, 取上清, 置冰上待测。
- 细菌、真菌样品处理:
按照细胞数量 (10^4 个): 提取液 ES10 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 提取液 ES10), 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, 取上清置于冰上待测。
- 血清等液体: 直接测定。

测定步骤:

- 分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长至 460nm, 蒸馏水调零。
- 样本测定, 在 EP 管中按照下表操作

试剂名称	对照管 (ul)	测定管 (ul)
粗酶液	250	250
提取液 ES10	640	540
AK066-A	10	10
AK066-B	100	100
AK066-C		100

混匀, 37℃水浴 30min, 1mL 玻璃比色皿, 对照管调零, 测定 A_{460} , $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

酶活性计算公式：

1. 组织 DAO 活力的计算

(1) 按蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生 1 μ mol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (\text{cpr} \times V \text{ 样本}) \div T = 18 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化产生 1 μ mol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO (U/g 鲜重)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (W \div V \text{ 提取} \times V \text{ 样本}) \div T = 18 \times \Delta A \div W$$

2. 血清（浆）DAO 活力的计算

单位的定义：每 mL 血清（浆）在反应体系中每分钟催化产生 1 μ mol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO (U/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样本} \div T = 18 \times \Delta A$$

3. 按细胞数量计算

单位的定义：每 10⁴ 个细胞在反应体系中每分钟催化产生 1 μ mol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO (U}10^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (500 \div V \text{ 提取} \times V \text{ 样本}) \div T = 0.036 \times \Delta A$$

注： V 反总：反应总体积，1 mL；V 样本：加入粗酶液体积，0.25mL；V 提取：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本鲜重(g)；d：光径，1cm； ϵ ：氧化型邻联茴香胺消光系数，7.5 $\times 10^{-3}$ mL/ μ mol/cm；T：反应时间，30min；500：细胞总数，500 万。

注意事项：

1. 如果 OD 值小于 0.01，适当加大提取用样本质量；OD 值大于 0.8，粗酶液可适当稀释，或者减少提取用样品质量。
2. 样品蛋白质含量需要另外测定。