

## 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, 可以催化多胺氧化为醛, 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伤程度。

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 500nm 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、无水乙醇、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:

- 分光光度计预热 30min, 调节波长至 500nm, 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 | 540      | 540      |
| AK066-A  | 10       | 10       |
| AK066-B  | 100      | 100      |
| AK066-C  |          | 100      |
| 无水乙醇     | 100      |          |

混匀, 37℃水浴 30min, 1mL 玻璃比色皿, 对照管调零, 测定  $A_{500}$ ,  $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

#### 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  $1\mu\text{mol}$  氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (c_{\text{pr}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 18 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

###### (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  $1\mu\text{mol}$  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  $1\mu\text{mol}$  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  $10^4$  个细胞在反应体系中每分钟催化产生  $1\mu\text{mol}$  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:**  $V_{\text{反总}}$ : 反应总体积, 1 mL;  $V_{\text{样本}}$ : 加入粗酶液体积, 0.25mL;  $V_{\text{提取}}$ : 加入提取液体积, 1mL;  $C_{\text{pr}}$ : 样本蛋白浓度, mg/mL;  $W$ : 样本鲜重(g);  $d$ : 光径, 1cm;  $\epsilon$ : 氧化型邻联茴香胺消光系数,  $7.5 \times 10^{-3} \text{ mL}/\mu\text{mol}/\text{cm}$ ;  $T$ : 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。