

## 二胺氧化酶(DAO)活性检测试剂盒说明书

### Diamine Oxidase Assay Kit

微量法

货号: AK067

规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES10	70ml×1	4°C保存
AK067-A	0.25ml×1	4°C保存
AK067-B	粉剂×1	4°C保存; 临用前加入 2ml 蒸馏水溶解, 4°C保存一个月
AK067-C	1 ml×1	4°C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/酶标仪、低温离心机、天平、水浴锅、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

粗酶液提取:

1. 组织:

按照组织质量 (g): 提取液体积 ES10 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液) 进行冰浴匀浆, 然后 10000g, 4°C 离心 20min, 取上清, 置冰上待测。

2. 细胞样品处理:

按照细胞数量 (10<sup>4</sup> 个): 提取液体积 ES10 (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°C, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

3. 血清等液体: 直接测定。

测定步骤:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长至 500nm, 蒸馏水调零。

2. 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	50	50
提取液 ES10	108	108
AK067-A	2	2
AK067-B	20	20
AK067-C		20
无水乙醇	20	

混匀, 37°C 水浴 30min, 蒸馏水调零, 测定 500nm 吸光值。ΔA=A 测定-A 对照。

酶活性计算公式:

a. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

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 $\mu$ mol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div d \div \epsilon \times V \text{ 反总} \div (Cpr \times V \text{ 样本}) \div T = 36 \times \Delta A \div Cpr$$

### (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 $\mu$ mol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (U/g 鲜重)} = \Delta A \div d \div \epsilon \times V \text{ 反总} \div (W \div V \text{ 提取} \times V \text{ 样本}) \div T = 36 \times \Delta A \div W$$

## 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 $\mu$ mol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (U/mL)} = \Delta A \div d \div \epsilon \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样本} \div T = 36 \times \Delta A$$

## 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 $\mu$ mol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div d \div \epsilon \times V \text{ 反总} \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 提取}) \div T = 0.072 \times \Delta A$$

**注：** V 反总：反应总体积，0.2 mL；V 样本：加入粗酶液体积，0.05mL；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，0.5cm； $\epsilon$ ：氧化型邻联茴香胺消光系数， $7.5 \times 10^{-3}$ mL/ $\mu$ mol/cm；T：反应时间，30min；500：细胞数量，500 万。

## b. 使用比色皿测定的计算公式如下

### 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 $\mu$ mol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

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

#### (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 $\mu$ mol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

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

## 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 $\mu$ mol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

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

## 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 $\mu$ mol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

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

**注：** V 反总：反应总体积，0.2 mL；V 样本：加入粗酶液体积，0.05mL；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； $\epsilon$ ：氧化型邻联茴香胺消光系数， $7.5 \times 10^{-3}$ mL/ $\mu$ mol/cm；T：反应时间，30min；500：细胞数量，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。