

## 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℃保存
AK067-A	0.25ml×1	4℃保存
AK067-B	粉剂×1	4℃保存; 临用前加入 4ml 蒸馏水溶解, 4℃保存一个月
AK067-C	1 ml×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 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、无水乙醇和蒸馏水。

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℃离心 20min, 取上清, 置冰上待测。
- 细胞样品处理:  
按照细胞数量 ( $10^4$  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℃, 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 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	50	50
提取液 ES10	108	108
AK067-A	2	2
AK067-B	20	20
AK067-C		10
无水乙醇	10	
混匀, 37℃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。

$$\text{DAO 活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div d \div \epsilon \times V \text{ 反总} \div (\text{cpr} \times V \text{ 样本}) \div T = 30 \times \Delta A \div \text{cpr}$$

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

$$\text{DAO 活性 (U/g 鲜重)} = \Delta A \div d \div \epsilon \times V \text{ 反总} \div (W \div V \text{ 提取} \times V \text{ 样本}) \div T = 30 \times \Delta A \div W$$

#### 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。

$$\text{DAO 活性 (U/mL)} = \Delta A \div d \div \epsilon \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样本} \div T = 30 \times \Delta A$$

#### 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。

$$\text{DAO 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div d \div \epsilon \times V \text{ 反总} \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 提取}) \div T = 0.06 \times \Delta A$$

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, 0.6cm;  $\epsilon$ : 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。

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

##### (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  $\mu$ 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。