

## 二胺氧化酶 (Diamine Oxidase, DAO) 试剂盒说明书

### 微量法 100T/48S

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

#### 测定意义:

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伤程度。

#### 测定原理:

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。

#### 试剂组成和配制:

产品名称	OX024-100T/48S	Storage
提取液: 液体	120ml	4°C
试剂一: 液体	0.3ml	4°C
试剂二: 液体	2.5ml	4°C
试剂三: 液体	1.2ml	4°C
说明书	一份	

#### 需自备仪器和用品:

天平、低温离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、蒸馏水。

#### 粗酶液提取:

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

2、细菌、真菌:按照细胞数量(10<sup>4</sup>个):提取液体积(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、分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 460nm,蒸馏水调零。

2、加样表



	对照管	测定管
粗酶液 (μl)	50	50
提取液 (μl)	128	108
试剂一 (μl)	2	2
试剂二 (μl)	20	20
试剂三 (μl)		20

混匀, 37°C水浴 30min, 微量石英比色皿/96 孔板, 蒸馏水调零, 测定 460nm 吸光值。ΔA=A 测定-A 对照。

### 酶活性计算公式:

#### a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算:

**酶活性定义:** 在 pH7.2, 温度为 37°C条件下, 每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所需的酶量为一个酶活力单位 (U)。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min/mg prot)} = \frac{A_{460}}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 18 \times A_{460} \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本质量计算:

**酶活性定义:** 在 pH7.2, 温度为 37°C条件下, 每克组织每分钟催化产生 1nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所需的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = \frac{A_{460}}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 18 \times A_{460} \div W$$

(3) 按细胞数量计算:

**酶活性定义:** 在 pH7.2, 温度为 37°C条件下, 每 10<sup>4</sup>个细胞每分钟催化产生 1nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所需的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} = \frac{A_{460}}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T = 18 \times A_{460} \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

**酶活性定义:** 在 pH7.2, 温度为 37°C条件下, 每毫升血清每分钟催化产生 1nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所需的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min/ml)} = \frac{A_{460}}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 18 \times A_{460}$$



$\epsilon$ : 氧化型邻联茴香胺毫摩尔消光系数: 7.5 L/mmol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应总体积, 0.2ml; V 样: 反应中样本体积, 0.05ml; V 样总: 加入提取液体积, 1ml; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/ml; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 30min

**b. 用 96 孔板测定的计算公式如下**

(1) 按样本蛋白浓度计算:

**酶活性定义:** 在 pH7.2, 温度为 37°C 条件下, 每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所需的酶量为一个酶活力单位 (U)。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min/mg prot)} = \frac{A_{460}}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 36 \times A_{460} \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本质量计算:

**酶活性定义:** 在 pH7.2, 温度为 37°C 条件下, 每克组织每分钟催化产生 1nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所需的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = \frac{A_{460}}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 36 \times A_{460} \div W$$

(3) 按细胞数量计算:

**酶活性定义:** 在 pH7.2, 温度为 37°C 条件下, 每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟催化产生 1nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所需的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} = \frac{A_{460}}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T = 36 \times A_{460} \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

**酶活性定义:** 在 pH7.2, 温度为 37°C 条件下, 每毫升血清每分钟催化产生 1nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所需的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min/ml)} = \frac{A_{460}}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 36 \times A_{460}$$

$\epsilon$ : 氧化型邻联茴香胺毫摩尔消光系数: 7.5 L/mmol/cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm; V 反总: 反应总体积, 0.2ml; V 样: 反应中样本体积, 0.05ml; V 样总: 加入提取液体积, 1ml; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/ml; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 30min。

**注意事项:**

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

