

二胺氧化酶（Diamine Oxidase, DAO）试剂盒说明书

微量法100T/48S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

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。

自备实验用品及仪器：

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。

试剂组成和配制：

提取液：液体120mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：液体0.3mL×1支，4℃保存。

试剂二：液体2.5mL×1瓶，4℃保存。

试剂三：液体1.2mL×1管，4℃保存。

粗酶液提取：

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℃离心20min，取上清，置冰上待测。

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℃，离心10min，取上清置于冰上待测。

血清等液体：直接测定。

测定操作表：

1、分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长至460nm，蒸馏水调零。

2、操作表

	对照管	测定管
粗酶液（ $\mu\text{L}$ ）	50	50
提取液（ $\mu\text{L}$ ）	128	108
试剂一（ $\mu\text{L}$ ）	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)。

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

(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。

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

(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104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。

$$\text{DAO活性 (nmol/min/104cell)} = \frac{\square}{V_{\text{反总}}} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T = 18 \times A_{460} \div \text{细胞数量}$$

(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。

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

ε: 氧化型邻联茴香胺摩尔消光系数: 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)。

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

(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。

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

(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104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。

$$\text{DAO活性 (nmol/min/104cell)} = \frac{\square}{\square} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T = 36 \times A_{460} \div \text{细胞数量}$$

(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。

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

$\epsilon$ : 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。