

二胺氧化酶 (DAO) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-YH007-48 微板法 48样)

有效期: 3个月

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60mL×2瓶, 4℃保存。

试剂一: 液体0.5mL×1支, 4℃保存。

试剂二: 液体2mL×1管, -20℃保存。

试剂三: 液体1mL×1管, 4℃保存。

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℃离心 20min,取上清,置冰上待测。
2. 细菌、真菌: 按照细胞数量(10^4 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。
3. 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(μ L)	50	50
提取液(μ L)	128	108
试剂一(μ L)	2	2
试剂二(μ L)	20	20
试剂三(μ L)		20

混匀, 37℃水浴 30min, 微量石英比色皿/96孔板, 蒸馏水调零, 测定 460nm 吸光值。 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$

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℃条件下, 每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1nmol H_2O_2 所需的酶量为一个酶活力单位 (U)。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 18 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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 H₂O₂ 所需的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{DAO 活性 (nmol/min/g 鲜重)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 18 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(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 H₂O₂ 所需的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{DAO 活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T \\ &= 18 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(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 H₂O₂ 所需的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 18 \times \Delta A$$

ϵ : 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; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.2mL; $V_{\text{样}}$: 反应中样本体积, 0.05mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; C_{pr} : 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 H₂O₂ 所需的酶量为一个酶活力单位 (U)。

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

(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 H₂O₂ 所需的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{DAO 活性 (nmol/min/g 鲜重)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 36 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(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 H₂O₂ 所需的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{DAO 活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T \\ &= 36 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(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 H₂O₂ 所需的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 36 \times \Delta A$$

ϵ : 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。