

二胺氧化酶（Diamine Oxidase, DAO）试剂盒说明书

（货号：ADS-F-QT043 紫外法 48 样）

一、产品简介：

二胺氧化酶（DAO, EC1.4.3.6）广泛存在于动物、植物和微生物中。催化二胺氧化为醛，其活性与核酸和蛋白合成密切相关。

该试剂盒通过 DAO 催化二胺产生醛和氨，生成的氨在谷氨酸脱氢酶的作用下与 α -酮戊二酸和还原型辅酶一（NADH）反应，使 NADH 氧化成 NAD^+ ，通过检测 NADH 于 340nm 处的下降量计算出 DAO 酶活性大小。

二、试剂盒组成和配置：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉体 1 支	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加入 1.2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉体 3 支	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部，每支加入 0.4mL 蒸馏水溶解备用，可分装后于-20°C保存。
试剂三	粉体 1 支	-20°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用，可分装后于-20°C保存。
试剂四	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	液体 2mL×1 支	4°C保存	临用前加 2ml 蒸馏水，分装冻存，避免反复冻融

三、所需的仪器和用品：

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿（光径 1cm）、可调式移液器、天平、低温离心机、蒸馏水。

四、二胺氧化酶（DAO）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 动物组织样本：

称取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。4°C×12000rpm 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（ 10^4 ）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 血清等液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 紫外分光光度计预热 30min，调节波长至 340nm。所有试剂解冻至室温（25°C）。

② 试剂一和二和三和四可按照 20:20:20:580 预混成混合液（依据反应次数用多少混多少，现配现用），加一次 640 μ L 即可，在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	60
试剂一	20
试剂二	20
试剂三	20
试剂四	580
混匀, 30°C下孵育 5min	
试剂五	40
混匀, 30°C下, 立即于 340nm 处读取吸光值 A1, 30min 后读取 A2, $\Delta A=A1-A2$ 。	

【注】若 ΔA 差值较小, 则需增加样本量 V1 (如增至 120 μ L, 则试剂四相应减少), 或延长反应时间 T (如增加至 1h 或更长再读取 A2), 则改变后的加样体积 V1 和反应时间 T 需加入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每毫克组织蛋白在每分钟内氧化 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 66.1 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算:

单位定义: 每克组织在每分钟内氧化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 66.1 \times \Delta A \div W$$

3、按细胞数量计算:

单位定义: 每 10⁴ 个细胞每分钟内氧化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活力}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 66.1 \times \Delta A \div 500$$

4、按液体体积计算:

单位定义: 每毫升液体每分钟内氧化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 66.1 \times \Delta A$$

V---加入提取液体积, 1 mL; V1---加入样本体积, 0.06mL; d---光径, 1cm;

V2---反应体系总体积, 7.4 $\times 10^{-4}$ L; ϵ ---NADH 摩尔消光系数, 6.22 $\times 10^3$ L/mol/cm;

W---样本质量, g; T---反应时间, 30min; 500---细胞数量, 万;

Cpr---蛋白浓度 (mg/mL), 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。