

二胺氧化酶（Diamine Oxidase, DAO）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-YH007-96 微板法 96 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。也与植物逆境生理有一定关系。

DAO 催化二胺产生醛和过氧化氢，产物过氧化氢与 4-氨基氨替吡啶等反应产生一种有色物质，其在 510nm 处有最大吸收峰。通过检测 510nm 处吸光值的变化量得出 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 100mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂一 | 液体 5mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂二 | 液体 13mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂三 | 粉剂 1 支 | 4°C保存 | 用前甩几下使试剂落入底部，再加 3mL 蒸馏水溶解备用。 |

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、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 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（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 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 酶标仪预热 30min，调节波长至 510nm。

② 所有试剂解冻至室温（25°C）。

③ 在 96 孔板中依次加入：

| 试剂名称（μL） | 测定管 |
|---|-----|
| 样本 | 20 |
| 试剂一 | 50 |
| 试剂二 | 130 |
| 试剂三 | 20 |
| 混匀，30°C下，立即在 510nm 处读取吸光值 A1，30min 后读取 A2， $\Delta A=A2-A1$ 。 | |

【注】若 ΔA 差值较小，则需增加样本量 V1（如增至 40μL，则试剂二相应减少），或延长反应时间 T（如增加至 1h 或更长），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：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟在反应体系中使 510nm 处吸光值变化 0.01 为一酶活单位。

$$\text{DAO}(\Delta\text{OD}_{510}/\text{min}/\text{mg prot})=\Delta A\div(V1\times\text{Cpr})\div 0.01\div T=166.7\times\Delta A\div\text{Cpr}$$

2、按样本质量计算：

酶活定义：每克组织每分钟在反应体系中使 510nm 处吸光值变化 0.01 为一个酶活单位。

$$\text{DAO 活性}(\Delta\text{OD}_{510}/\text{min}/\text{g 鲜重})=\Delta A\div(W\times V1\div V)\div 0.01\div T=166.7\times\Delta A\div W$$

3、按细胞数量计算：

酶活定义：每 10^4 个细胞每分钟在反应体系中使 510nm 处吸光值变化 0.01 为一个酶活单位。

$$\text{DAO 活性}(\Delta\text{OD}_{510}/\text{min}/10^4\text{cell})=\Delta A\div(500\times V1\div V)\div 0.01\div T=0.34\times\Delta A$$

4、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟在反应体系中使 510nm 处吸光值变化 0.01 为一个酶活单位。

$$\text{DAO 活性}(\Delta\text{OD}_{510}/\text{min}/\text{mL})=\Delta A\div V1\div 0.01\div T=166.7\times\Delta A$$

V---加入提取液体积， 1mL；

V1---反应中样本体积， 0.02mL；

W---样本质量， g；

T---反应时间， 30min

Cpr---样本蛋白浓度， mg/mL； 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。