

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 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 5mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	液体 13mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂 1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 3mL 蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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℃×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℃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、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 510nm。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。

③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管
样本	20
试剂一	50
试剂二	130
试剂三	20

混匀，30℃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 40 μ L，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。

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

2、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。

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

3、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。

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

4、按细胞数量计算：

酶活定义：每 10⁴ 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。

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

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；

500---细菌或细胞总数，万。

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。