

二胺氧化酶（Diamine Oxidase, DAO）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-QT043 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。

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	粉体 1 支	4℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.2mL 蒸馏水溶解备用。 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉体 3 支	-20℃ 保存	每支： 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 0.4mL 蒸馏水溶解备用，可分装后于-20℃保存。
试剂三	粉体 1 支	-20℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用，可分装后于-20℃保存。
试剂四	液体 13mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂五	粉剂×1 支	4℃ 保存	1. 临用前 8000g 4℃ 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 2ml 蒸馏水，分装冻存，避免反复冻融。

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 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℃×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（ 10^4 ）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。③ 血清等
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 340nm。所有试剂解冻至室温（25℃）。
- ② 试剂一和二和三和四可按照 10:10:10:130 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 160μL 即可，在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	130
混匀，30℃下孵育 5min	
试剂五	20
混匀，30℃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 40μL，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。

$$\text{DAO 活力}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 107.2 \times \Delta A \div W$$

2、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。

$$\text{DAO 活力}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 107.2 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

3、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。

$$\text{DAO 活力}(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 107.2 \times \Delta A$$

4、按细胞数量计算：

单位定义：每 10^4 个细胞每分钟内氧化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活力}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 107.2 \times \Delta A \div 500$$

V---加入提取液体积，1 mL； V1---加入样本体积，0.02mL； d---96 孔板光径，0.5cm；

V2---反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ---NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 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。

