

二胺氧化酶 (DAO) 活性检测试剂盒 (分光光度计法)

(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0267	二胺氧化酶 (DAO) 活性检测试剂盒	50 管/24 样

产品内容

名称	规格	储存条件
提取液	液体 80mL × 1 瓶	4℃
试剂一	液体 0.6mL × 1 瓶	4℃
试剂二	液体 6mL × 1 瓶	4℃
试剂三	液体 3mL × 1 瓶	4℃

一、产品说明

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伤程度。

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。

二、自备材料

可见分光光度计、低温离心机、天平、移液器、1mL 玻璃比色皿、蒸馏水。

三、样品制备

- 1、组织:称取约 0.1g 组织,加入 1mL 提取液,冰浴匀浆后,10000g 4℃ 离心 20min,取上清液置于冰上待测。
- 2、细菌或培养细胞:收集不少于 500 万个细胞,加入 1mL 提取液,超声破碎(冰浴,功率 300W,超声 3s,间隔 7s,总时间 3min),10000g 4℃ 离心 10min,取上清液放置于 4℃ 待测。
- 3、血清或血浆:直接检测。

四、操作步骤

正式测定前,必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 1、分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 460nm,蒸馏水调零。
- 2、按照下表操作:

试剂名称 (μL)	对照管	测定管
粗酶液	250	250
提取液	640	540
试剂一	10	10
试剂二	100	100
试剂三		100

混匀, 37°C 水浴 30min, 1mL 玻璃比色皿, 对照管调零, 测定 A460。

五、DAO 活性的计算

1、按照样本蛋白浓度计算:

单位定义: 在 pH7.2、37°C 条件下, 每毫克蛋白每分钟催化产生 1nmol H₂O₂ 所需的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min/mg prot)} = \frac{A460}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 18 \times A460 \div C_{\text{pr}}$$

2、按照样本鲜重计算:

单位定义: 在 pH7.2、37°C 条件下, 每 g 组织每分钟催化产生 1nmol H₂O₂ 所需的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min/g)} = \frac{A460}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 18 \times A460 \div W$$

3、按照细胞/细菌数量计算:

单位定义: 在 pH7.2、37°C 条件下, 每 10⁴ 个细胞每分钟催化产生 1nmol H₂O₂ 所需的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min/10}^4\text{ ceLL)} = \frac{A460}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T = 18 \times A460 \div \text{细胞数量}$$

4、按照液体体积计算:

单位定义: 在 pH7.2、37°C 条件下, 每毫升液体每分钟催化产生 1nmol H₂O₂ 所需的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min/mL)} = \frac{A460}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 18 \times A460$$

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, 1mL; $V_{\text{样}}$: 反应中样本体积, 0.25mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL; T : 反应时间, 30min。

六、注意事项

1、如果 OD 值小于 0.01, 适当加大提取用的样本质量; 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。