

二胺氧化酶 (DAO) 活性检测试剂盒 (微量法)
(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
YFX0268	二胺氧化酶 (DAO) 活性检测试剂盒	100 管/48 样

产品内容

名称	规格	储存条件
提取液	液体 120mL × 1 瓶	4℃
试剂一	液体 0.3mL × 1 瓶	4℃
试剂二	液体 2.5mL × 1 瓶	4℃
试剂三	液体 1.2mL × 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/酶标仪、低温离心机、天平、移液器、微量石英比色皿/96 孔板、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	50	50
提取液	128	108
试剂一	2	2
试剂二	20	20
试剂三		20

混匀, 37°C 水浴 30min, 微量石英比色皿/96 孔板, 蒸馏水调零, 测定 A460,
 $\Delta A=A$ 测定-A 对照。

五、DAO 活性的计算

A. 用 96 孔板测定的计算公式如下:

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。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min/mg prot)} = \frac{A460}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 36 \times A460 \div \text{Cpr}.$$

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。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min/g)} = \frac{A460}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 36 \times A460 \div W.$$

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。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min / 10}^4 \text{ ceLL)} = \frac{A460}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T = 36 \times A460 \div \text{细胞数量}.$$

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。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min / mL)} = \frac{A460}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 36 \times A460.$$

ϵ : 氧化型邻联茴香胺毫摩尔消光系数: 7.5 L / mmol / cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm; V 反总: 反应总体积, 0.2mL; V 样: 反应中样本体积, 0.05mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 30min.

B. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下:

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。

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

5、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。

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

6、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。

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

= 18 × A460 ÷ 细胞数量。

7、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。

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

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 反总: 反应总体积, 1mL; V 样: 反应中样本体积, 0.25mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 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。