

## 二胺氧化酶 (DAO) 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC1280

规格：50T/24S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

| 试剂名称 | 规格            | 保存条件    |
|------|---------------|---------|
| 提取液  | 液体 30 mL×1 瓶  | 2-8°C保存 |
| 试剂一  | 液体 3 mL×1 瓶   | 2-8°C保存 |
| 试剂二  | 液体 40 mL×1 瓶  | 2-8°C保存 |
| 试剂三  | 液体 10 mL×1 瓶  | 2-8°C保存 |
| 标准品  | 液体 140 μL×1 支 | 2-8°C保存 |

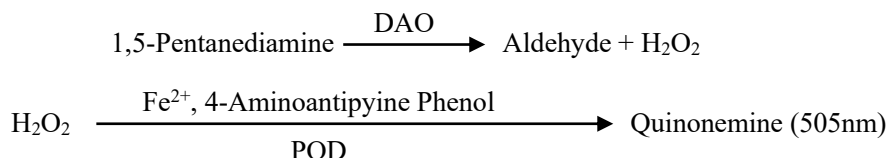
溶液的配制：

1. 标准品：临用前取 102 μL 加入 898μL 蒸馏水得到 1mol/L (即 1000μmol/mL) 的过氧化氢溶液，2-8°C保存 4 周。
2. 0.25μmol/mL 标准溶液的配制：取 10μL 1000μmol/mL 标准液和 990μL 蒸馏水混合配成 10μmol/mL 标准液；再取 25μL 10μmol/mL 标准液和 975μL 蒸馏水混合配成 0.25μmol/mL 标准溶液备用。

### 产品说明：

DAO (EC1.4.3.6) 广泛存在于动物 (肠黏膜、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质合成密切相关，能够反映肠道机械屏障的完整性和受损程度。

DAO 催化尸胺产生醛和过氧化氢，H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化亚铁氰化钾中的 Fe<sup>2+</sup>生成 Fe<sup>3+</sup>，Fe<sup>3+</sup>进一步与 4-氨基安替比林和酚反应生成红色醌类化合物，在 505nm 处有特征吸收峰，通过测定 505nm 处的吸光值来计算 DAO 的活性。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

### 需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

### 操作步骤：

#### 一、样本处理 (可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献)

1. 细胞或细菌：收集细胞或细菌到离心管内，离心后弃上清；按照细胞/细菌数量 (10<sup>4</sup> 个)：提取液体积 (mL) 为 500 ~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞/细菌加入 1mL 提取液)，冰浴超声波破碎细胞/细菌 (功率 300W，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min)；10000g，4°C离心 20min，取上清置冰上待测。

2. 组织：按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）进行冰浴匀浆；10000g，4℃离心 20min，取上清置冰上待测。
3. 血清（浆）等液体：直接检测，若溶液有浑浊则离心后取上清进行测定。

## 二、测定步骤

1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 505nm，蒸馏水调零。

2、操作表：（在 1.5mL EP 管中依次加入下列试剂）

| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 对照管 | 标准管 | 空白管 |
|-----------|-----|-----|-----|-----|
| 样本        | 225 | 225 | -   | -   |
| 标准品       | -   | -   | 225 | -   |
| 试剂一       | 90  | -   | -   | -   |
| 试剂二       | 600 | 600 | 600 | 600 |
| 试剂三       | 120 | 120 | 120 | 120 |
| 蒸馏水       | -   | 90  | 90  | 315 |

涡旋混匀，37℃水浴或恒温培养箱中准确反应 1h。10000g，4℃离心 10min，取上清液于 1mL 玻璃比色皿，测定 505nm 处吸光值 A，分别记为 A 测定管、A 对照管、A 标准管、A 空白管。计算  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。每个测定管需设一个对照管，标准管和空白管只需测 1-2 次。

## 三、DAO活性计算

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每小时每 mg 组织蛋白分解尸胺产生 1μmol 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (U/mg prot)} = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样本}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样本}}) \div T \times F$$

$$= 0.25 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times F$$

(2) 按样本质量计算：

单位的定义：每小时每 g 组织分解尸胺产生 1μmol 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (U/g 质量)} = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{提取}} \div W \div T \times F = 0.25 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F$$

(3) 按细胞/细菌数量计算：

单位的定义：每小时每 10<sup>4</sup> 个细胞/细菌分解尸胺产生 1μmol 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{提取}} \div N \div T \times F = 0.25 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N \times F$$

(4) 按液体体积计算：

单位的定义：每小时每 mL 液体分解尸胺产生 1μmol 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (U/mL)} = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{样本}} \div T \times F = 0.25 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F$$

C 标准：标准溶液浓度，0.25μmol/mL；V 提取：提取液体积，1mL；V 样本：加入反应体系中样本体积，0.225mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL，需自行测定；W：样本质量，g；N：细胞数量，以 10<sup>4</sup> 计；T：反应时间，1h；F：稀释倍数。

## 实验实例：

1. 称取 0.1009g 竹叶样本，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆，10000g 4℃离心 20min，取上清置冰上待测，之后按照测定步骤，用 1mL 玻璃比色皿测得计算  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 1.553 - 0.638 = 0.915$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$

准管-A 空白管=0.353-0.059=0.294；按样本质量计算酶活得：

DAO 活性(U/g 质量) =  $0.25 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F = 7.711 \text{ U/g 质量}$

2. 称取 0.1000g 十二指肠样本，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆，10000g 4°C离心 20min，取上清置冰上待测，之后按照测定步骤，用 1mL 玻璃比色皿测得计算  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.363 - 0.251 = 0.112$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}} = 0.353 - 0.059 = 0.294$ ；按样本质量计算酶活得：

DAO 活性(U/g 质量) =  $0.25 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F = 0.952 \text{ U/g 质量}$

#### 相关系列产品：

BC0020/BC0025 丙二醛（MDA）含量检测试剂盒

BC0690/BC0695 葡萄糖氧化酶（GOD）活性检测试剂盒

BC1090/BC1095 黄嘌呤氧化酶（XOD）活性检测试剂盒

BC1070/BC1275 蛋白质羰基含量检测试剂盒