

使用说明书

Instruction Manual

二胺氧化酶(DAO)活性检测试剂盒（微量法）

Diamine Oxidase Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

二胺氧化酶 (Diamine Oxidase, 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。

检测原理

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 500nm 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。

产品组成及储存条件

100T/48S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0068M-ES	70mL×1	4℃保存。
CB0068M-A	0.25mL×1	4℃保存。
CB0068M-B	粉剂×1	4℃保存；临用前加入 4mL 蒸馏水溶解，4℃保存一个月。
CB0068M-C	1 mL×1	4℃保存。

操作说明

一、自备用品：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、天平、水浴锅、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵、冰、无水乙醇和蒸馏水。

二、粗酶液提取：

1. 组织样品处理：

按照组织质量(g)：提取液 CB0068M-ES 体积 (mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL CB0068M-ES）进行冰浴匀浆，然后 10000g，4℃离心 20min，取上清，置冰上待测。

2. 细胞样品处理：

按照细胞数量（ 10^4 个）：提取液 CB0068M-ES 体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL CB0068M-ES），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间3min）；然后 10000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。

3. 血清等液体样品：直接测定。

三、测定步骤：

- 分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长至 500nm，蒸馏水调零。
- 样本测定，在 EP 管中按照下表操作：

试剂名称	对照管 (μL)	测定管 (μL)
粗酶液	50	50
CB0068M-ES	108	108
CB0068M-A	2	2
CB0068M-B	20	20
CB0068M-C		10
无水乙醇	10	
混匀, 37℃水浴 30min, 蒸馏水调零, 测定 500nm 吸光值。ΔA=A 测定-A 对照。		

四、酶活性计算公式：

a. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 组织 DAO 活力的计算

(1) 按蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生 1μmol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div d \div \epsilon \times V_{\text{反总}} \div (cpr \times V_{\text{样本}}) \div T = 30 \times \Delta A \div cpr$$

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化产生 1μmol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (U/g 鲜重)} = \Delta A \div d \div \epsilon \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 30 \times \Delta A \div W$$

2. 血清（浆）DAO 活力的计算

单位的定义：每 mL 血清（浆）在反应体系中每分钟催化产生 1μmol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (U/mL)} = \Delta A \div d \div \epsilon \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样本}} \div T = 30 \times \Delta A$$

3. 按细胞数量计算：

单位的定义：每 10⁴ 个细胞在反应体系中每分钟催化产生 1μmol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div d \div \epsilon \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \div T = 0.06 \times \Delta A$$

注： V 反总：反应总体积，0.2 mL；V 样本：加入粗酶液体积，0.05mL；V 提取，加入提取液体积，1mL；cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本鲜重(g)；d：光径，0.6cm；ε：氧化型邻联茴香胺消光系数，7.5×10⁻³ mL/μmol/cm；T：反应时间，30min；500：细胞数量，500 万。

b. 使用比色皿测定的计算公式如下

1. 组织 DAO 活力的计算

(1) 按蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生 1μmol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div d \div \epsilon \times V_{\text{反总}} \div (cpr \times V_{\text{样本}}) \div T = 18 \times \Delta A \div cpr$$

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化产生 1 μ mol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (U/g 鲜重)} = \Delta A \div d \div \epsilon \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 18 \times \Delta A \div W$$

2. 血清（浆）DAO 活力的计算

单位的定义：每 mL 血清（浆）在反应体系中每分钟催化产生 1 μ mol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (U/mL)} = \Delta A \div d \div \epsilon \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样本}} \div T = 18 \times \Delta A$$

3. 按细胞数量计算

单位的定义：每 10⁴ 个细胞在反应体系中每分钟催化产生 1 μ mol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div d \div \epsilon \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \div T = 0.036 \times \Delta A$$

注： V 反总：反应总体积，0.2 mL；V 样本：加入粗酶液体积，0.05mL；V 提取，加入提取液体积，1mL；cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本鲜重，g；d：光径，1cm；ε：氧化型邻联茴香胺消光系数，7.5×10⁻³ mL/μmol/cm；T：反应时间，30min；500：细胞数量，500 万。

■ 注意事项

1. 如果 OD 值小于 0.01，适当加大提取用样本质量；OD 值大于 0.8，粗酶液可适当稀释，或者减少提取用样品质量。
2. 样品蛋白质含量需要另外测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
3. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

