

使用说明书

Instruction Manual

二胺氧化酶(DAO)活性检测试剂盒（可见分光光度法）

Diamine Oxidase Assay Kit (Visible Spectrophotometry)

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，可以催化多胺氧化为醛，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

50T/24S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0068V-ES	80mL×1	4℃保存。
CB0068V-A	0.5mL×1	4℃保存。
CB0068V-B	粉剂×1	4℃保存；临用前加入 5mL 蒸馏水溶解，4℃可保存一个月。
CB0068V-C	5mL×1	4℃保存。

操作说明

一、自备用品：

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、无水乙醇、冰和蒸馏水。

二、粗酶液提取：

- 组织：按照组织质量（g）：
组织：按照组织质量（g）：提取液 CB0068V-ES 体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL CB0068V-ES）进行冰浴匀浆，然后 10000g，4℃离心 20min，取上清，置冰上待测。
- 细菌、真菌样品处理：
按照细胞数量（10⁴ 个）：提取液 CB0068V-ES 体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL CB0068V-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。
- 血清等液体：直接测定。

三、测定步骤：

- 分光光度计预热 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	250	250
CB0068V-ES	540	540
CB0068V-A	10	10
CB0068V-B	100	100
CB0068V-C		100
无水乙醇	100	
混匀, 37°C水浴 30min, 1mL 玻璃比色皿, 对照管调零, 测定 A500, ΔA=A 测定-A 对照。		

四、酶活性计算公式：

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。

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

(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 1μmol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

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

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 1μmol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

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

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 1μmol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO (U10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (500 \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 0.036 \times \Delta A$$

注： V 反总：反应总体积, 1mL; V 样本：加入粗酶液体积, 0.25mL; V 提取：加入提取液 CB0068V-ES 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, 7.5×10⁻³mL/μmol/cm; T: 反应时间, 30min; 500: 细胞总数, 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。

