二胺氧化酶(DAO)试剂盒

微板法

本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断

使用说明书

货号：JL-T0829　　**有 效 期：**6 个月

规格：48T(48S)/96T(96S)　　**保存温度：**2-8℃和-20℃

实验原理：

二胺氧化酶（DAO，EC1.4.3.6）广泛存在于动物、植物和微生物中。催化二胺氧化为醛，其活性与核酸和蛋白合成密切相关。该试剂盒通过 DAO 催化二胺产生醛和氨，生成的氨在谷氨酸脱氢酶的作用下与α-酮戊二酸和还原型辅酶一(NADH)反应,使 NADHA 氧化成 NAD^+,通过检测 NADH 于 340nm 处的下降量计算得出 DAO 酶活性大小。本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法（货号：JL-T0336）。

注意事项：

1. 不能使用过期产品，不同货号和批号组分不得混用。
2. 本试剂开封后请尽快使用，以免空气、采样污染引起试剂变质。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 如果可能传播疾病，所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。
5. 试剂严格按保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。试剂盒中如有提供粉剂，使用前请甩几下，使粉剂落入底部。

产品组成：

试剂名称	规格（48T/40S）	规格（96T/88S）	保存条件
提取液	50mL×1 瓶	100mL×1 瓶	2-8℃
缓冲液	10mL×1 瓶	20mL×1 瓶	2-8℃
试剂一	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃，避光
试剂二	100μL×1 瓶	200μL×1 瓶	-20℃，避光

所需仪器耗材及试剂：

酶标仪、可调式移液器、天平、低温离心机、蒸馏水。

样本处理及要求：

1. 建议实验前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定，根据预实验的结果，如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩，样本的稀释液为提取液。

2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议做预实验验证其检测有效性。

3. **血清（浆）等液体样本**：直接测定。若浑浊，离心后取上清测定。

4. **组织样本：**按照组织质量(g):提取液体积(mL)为 1:5~10 的比例(例如约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）进行匀浆，匀浆后，4℃，10000 g 离心 10min，取上清置冰上待测。如需检测蛋白浓度，可留取部分上清用于蛋白浓度测定。

5. **细菌/细胞样本：**收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌/细胞数量（10^4）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例(建议按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液)，超声波破碎细菌或细胞（功率 200w，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次)，10000 g，离心 10min，取上清待测。

检测前准备工作：

1. 请提前取出试剂盒，平衡至室温。

2. **工作液的配置：**取一瓶试剂一，加入 10mL 的缓冲液和 100μL 试剂二，混匀，现用现配，当天使用完毕。

操作步骤：

1. **酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。**

2. **样本测定（在石英 96 孔板中依次加入）：**

试剂名称(μL)	测定孔
样本	20
工作液	200
充分混匀，样本与工作液混合的同时立即计时，轻轻振动孔板，340nm 处立即（30s 内）读取 OD 值，记为 A_1。然后置于 37℃孵育，10 分钟后再次读取 OD 值，记为 A_2，计算$\triangle A=A_1-A_2$。	

实验结果结算：

1. **按液体样本计算：**

单位定义：每毫升液体每分钟内氧化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

DAO 活力(nmol/min/mL)=[(△A÷(ε×d)×V 反×10^9]÷V 样÷T×N=257.235×△A×N

2. **按样本质量计算：**

单位定义：每克组织在每分钟内氧化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

DAO 活力(nmol/min/g)=[(△A÷(ε×d)×V 反×10^9]÷(W×V 样÷V 提)÷T×N=257.235×△A÷W×N

3. **按蛋白浓度计算：**

单位定义：每毫克组织蛋白在每分钟内氧化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

DAO 活力(nmol/min/mg prot)=[(△A÷(ε×d)×V 反×10^9]÷(Cpr×V 样)÷T×N=257.235×△A÷Cpr×N

4. **按细菌或细胞密度计算：**

单位定义：每 10^4 个细胞每分钟内氧化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

DAO 活力(nmol/min/10^4cell)=[(△A÷(ε×d)×V 反×10^9]÷(500×V 样÷V 提)÷T×N=257.235×△A÷500×N

注：

△A：样本测定管变化 OD 值，A_1-A_2　　$V_{反}$：反应体系总体积，2.2×10^{-4}L

$V_{样}$：加入样本体积，0.02mL　　$V_{提}$：加入提取液体积，1mL

T：反应时间，10min　　N：样本稀释倍数

W：样本鲜重，g　　Cpr：待测样本的蛋白浓度，mg/mL

d：比色光径=体积÷底面积，标准 96 孔平底板底面积 0.32cm²中加入 0.22mL 液体时光径为 0.6875cm

ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3L/mol/cm

参考样本数据：

以下数据仅供参考：

样本类型	稀释倍数	参考值
人血清	不稀释	5.659nmol/min/mL
人血浆	不稀释	1.801nmol/min/mL
大鼠血浆	不稀释	5.659nmol/min/mL
大鼠肝脏（10%匀浆）	2 倍稀释	1.168nmol/min/mg prot

咨询电话：400-0066-400

传　　真：021-55660885

电子邮箱：shjlsw@163.com

网　　址：www.jonln.com