

## 二胺氧化酶（Diamine Oxidase, DAO）试剂盒说明书

（货号：JL-T2401 微板法 96 样）

### 一、产品简介：

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  $\alpha$ -酮戊二酸和还原型辅酶一（NADH）反应，使 NADH 氧化成  $\text{NAD}^+$ ，通过检测 NADH 于 340nm 处的下降量计算得出 DAO 酶活性大小。

### 二、试剂盒组成和配置：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加入 1.2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉体 mg×3 支	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部，每支加入 0.4mL 蒸馏水溶解备用，可分装后于-20℃保存。
试剂三	粉体 mg×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用，可分装后于-20℃保存。
试剂四	液体 13mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂 mg×1 支	4℃保存	用前甩几下使试剂落入底部，再加 3mL 蒸馏水溶解备用。

### 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、天平、低温离心机、蒸馏水。

### 四、二胺氧化酶（DAO）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

#### 1、样本制备：

##### ① 动物组织样本：

称取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取。

##### ② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（ $10^4$ ）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

##### ③ 血清等液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

#### 2、上机检测：

##### ① 酶标仪预热 30min，调节波长至 340nm。所有试剂解冻至室温（25℃）。

##### ③ 试剂一和二和三和四可按照 10:10:10:130 预混成混合液（依据反应次数用多少混多少，现配现用），加一次 160μL 即可，在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	130
混匀, 30°C下孵育 5min	
试剂五	20
混匀, 30°C下, 立即于 340nm 处读取吸光值 A1, 30min 后读取 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。	

【注】若 $\Delta A$  差值较小, 则需增加样本量 V1 (如增至 40μL, 则试剂四相应减少), 或延长反应时间 T (如增加至 1h 或更长再读取 A2), 则改变后的加样体积 V1 和反应时间 T 需加入计算公式重新计算。

## 五、结果计算:

### 1、按样本蛋白浓度计算:

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

$$\text{DAO 活力}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 107.2 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

### 2、按样本鲜重计算:

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。

$$\text{DAO 活力}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 107.2 \times \Delta A \div W$$

### 3、按细胞数量计算:

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

$$\text{DAO 活力}(\text{nmol/min/10}^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 107.2 \times \Delta A \div 500$$

### 4、按液体体积计算:

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。

$$\text{DAO 活力}(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 107.2 \times \Delta A$$

V--加入提取液体积, 1 mL;

V1--加入样本体积, 0.02mL;

d--96 孔板光径, 0.5cm;

V2--反应体系总体积, 2×10<sup>-4</sup> L;  $\epsilon$ --NADH 摩尔消光系数, 6.22×10<sup>3</sup> L / mol /cm; W--样本质量, g;

T--反应时间, 30min;

500--细胞数量, 万;

Cpr--蛋白浓度 (mg/mL), 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。