

二胺氧化酶 (Diamine Oxidase, DAO) 试剂盒说明书

(货号: G0134W 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。也与植物逆境生理有一定关系。

DAO 催化二胺产生醛和过氧化氢, 产物过氧化氢与 4-氨基氨基吡啶等反应产生一种有色物质, 其在 510nm 处有最大吸收峰。通过检测 510nm 处吸光值的变化量得出 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	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 13mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	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 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 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 510nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25℃)。

③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	50
试剂二	130
试剂三	20
混匀, 30℃下, 立即在 510nm 处读取吸光值 A1, 30min 后读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】若 ΔA 差值较小, 则需增加样本量 V1 (如增至 40μL, 则试剂二相应减少), 或延长

反应时间 T（如增加至 1h 或更长），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：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟在反应体系中使 510nm 处吸光值变化 0.01 为一酶活单位。

$$\text{DAO}(\Delta\text{OD}_{510}/\text{min}/\text{mg prot})=\Delta A\div(V1\times\text{Cpr})\div0.01\div T=166.7\times\Delta A\div\text{Cpr}$$

2、按样本质量计算：

酶活定义：每克组织每分钟在反应体系中使 510nm 处吸光值变化 0.01 为一个酶活单位。

$$\text{DAO 活性}(\Delta\text{OD}_{510}/\text{min}/\text{g 鲜重})=\Delta A\div(W\times V1\div V)\div0.01\div T=166.7\times\Delta A\div W$$

3、按细胞数量计算：

酶活定义：每 10^4 个细胞每分钟在反应体系中使 510nm 处吸光值变化 0.01 为一个酶活单位。

$$\text{DAO 活性}(\Delta\text{OD}_{510}/\text{min}/10^4\text{cell})=\Delta A\div(500\times V1\div V)\div0.01\div T=0.34\times\Delta A$$

4、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟在反应体系中使 510nm 处吸光值变化 0.01 为一个酶活单位。

$$\text{DAO 活性}(\Delta\text{OD}_{510}/\text{min}/\text{mL})=\Delta A\div V1\div0.01\div T=166.7\times\Delta A$$

V---加入提取液体积，1mL；

V1---反应中样本体积，0.02mL；

W---样本质量，g；

T---反应时间，30min

Cpr---样本蛋白浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。