

二胺氧化酶 (Diamine Oxidase, DAO) 试剂盒说明书

(货号: G0154F 紫外法 48 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 α -酮戊二酸和还原型辅酶 I (NADH) 反应, 使 NADH 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。

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 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	4°C 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°C 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°C 保存。
试剂三	粉体 mg×1 支	-20°C 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°C 保存。
试剂四	液体 30mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂五	液体 2mL×1 支	4°C 保存	

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、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°C×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°C 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 (10⁴): 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 紫外分光光度计预热 30min, 调节波长至 340nm。所有试剂解冻至室温 (25°C)。

② 试剂一和二和三和四可按照 20:20:20:580 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 640 μ L 即可, 在 1mL 石英比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	60
试剂一	20
试剂二	20
试剂三	20
试剂四	580
混匀, 30°C下孵育 5min	
试剂五	40
混匀, 30°C下, 立即于 340nm 处读取吸光值 A1, 30min 后读取 A2, ΔA=A1-A2。	

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。

$$\text{DAO 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T = 66.1 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{DAO 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 66.1 \times \Delta A \div W$$

3、按细胞数量计算:

单位定义: 每 10⁴ 个细胞每分钟内氧化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活力}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 66.1 \times \Delta A \div 500$$

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。

$$\text{DAO 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_1 \div T = 66.1 \times \Delta A$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.06mL;

d---光径, 1cm;

V2---反应体系总体积, 7.4×10⁻⁴ L; ε---NADH 摩尔消光系数, 6.22×10³ 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。