

二胺氧化酶（Diamine Oxidase, DAO）试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

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。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。

测定原理：

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 460nm 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。

自备实验用品及仪器：

天平、低温离心机、可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿、蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体 80mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 0.6mL×1 支，4℃ 保存。

试剂二：液体 6mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：液体 3mL×1 瓶，4℃ 保存。

粗酶液提取：

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

测定操作表

	对照管	测定管
粗酶液 (μL)	250	250
提取液 (μL)	640	540
试剂一 (μL)	10	10
试剂二 (μL)	100	100
试剂三 (μL)		100
混匀, 37℃水浴 30min, 1mL 玻璃比色皿, 对照管调零, 测定 A ₄₆₀		

酶活性计算公式:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

酶活性定义: 在 pH7.2, 温度为 37℃条件下, 每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1nmol H₂O₂ 所需的酶量为 一个酶活力单位 (U)。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min/mg prot)} = \frac{A_{460}}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 18 \times A_{460} \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本质量计算:

酶活性定义: 在 pH7.2, 温度为 37℃条件下, 每克组织每分钟催化产生 1nmol H₂O₂ 所需的酶量定义为一 个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min/g)} = \frac{A_{460}}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 18 \times A_{460} \div W$$

(3) 按细胞数量计算:

酶活性定义: 在 pH7.2, 温度为 37℃条件下, 每 10⁴ 个细胞每分钟催化产生 1nmol H₂O₂ 所需的酶量定义 为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} = \frac{A_{460}}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T = 18 \times A_{460} \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

酶活性定义: 在 pH7.2, 温度为 37℃条件下, 每毫升血清每分钟催化产生 1nmol H₂O₂ 所需的酶量定义为一 个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min/mL)} = \frac{A_{460}}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 18 \times A_{460}$$

ε: 氧化型邻联茴香胺毫摩尔消光系数: 7.5 L/mmol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应总体积, 1mL; V 样: 反应中样本体积, 0.25mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; C_{pr}: 样本蛋白浓度, mg/mL; T: 反应时间, 30min

注意事项:

- 1、如果 OD 值小于 0.01, 适当加大提取用的样本质量; OD 值大于 0.8, 粗酶液可适当稀释, 或者减少提取用样本量。
- 2、样品蛋白质含量需要另外测定。