

## 二胺氧化酶（Diamine Oxidase, DAO）试剂盒说明书

微量法 100T/48S

**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/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、蒸馏水。

### 试剂组成和配制：

提取液：液体 120mL×1 瓶，4℃保存。

试剂一：液体 0.3mL×1 支，4℃保存。

试剂二：液体 2.5mL×1 瓶，4℃保存。

试剂三：液体 1.2mL×1 管，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：

1、分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长至 460nm，蒸馏水调零。

2、操作表

|                                                                                             | 对照管 | 测定管 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 粗酶液（ $\mu\text{L}$ ）                                                                        | 50  | 50  |
| 提取液（ $\mu\text{L}$ ）                                                                        | 128 | 108 |
| 试剂一（ $\mu\text{L}$ ）                                                                        | 2   | 2   |
| 试剂二（ $\mu\text{L}$ ）                                                                        | 20  | 20  |
| 试剂三（ $\mu\text{L}$ ）                                                                        |     | 20  |
| 混匀，37℃水浴 30min，微量石英比色皿/96 孔板，蒸馏水调零，测定 460nm 吸光值。 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ |     |     |

**酶活性计算公式：**

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所需的酶量为一个酶活力单位 (U)。

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

(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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所需的酶量定义为一个酶活力单位。

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

(3) 按细胞数量计算：

**酶活性定义：**在 pH7.2，温度为 37℃ 条件下，每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟催化产生 1nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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，0.2mL；V 样：反应中样本体积，0.05mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：反应时间，30min

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

(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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所需的酶量为一个酶活力单位 (U)。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min/mg prot)} = \frac{A_{460}}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 36 \times A_{460} \div \text{Cpr}$$

(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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所需的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = \frac{A_{460}}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 36 \times A_{460} \div W$$

(3) 按细胞数量计算:

**酶活性定义:** 在 pH7.2, 温度为 37℃ 条件下, 每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟催化产生 1nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所需的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} = \frac{A_{460}}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T = 36 \times A_{460} \div \text{细胞数量}$$

(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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所需的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (nmol/min/mL)} = \frac{A_{460}}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 36 \times A_{460}$$

$\varepsilon$ : 氧化型邻联茴香胺毫摩尔消光系数: 7.5 L/mmol/cm;  $d$ : 96 孔板光径, 0.5cm;  $V_{\text{反总}}$ : 反应总体积, 0.2mL;  $V_{\text{样}}$ : 反应中样本体积, 0.05mL;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1mL;  $C_{\text{pr}}$ : 样本蛋白浓度, mg/mL;  $W$ : 样本质量, g;  $T$ : 反应时间, 30min

**注意事项:**

- 1、如果 OD 值小于 0.01, 适当加大提取用样本量; 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。