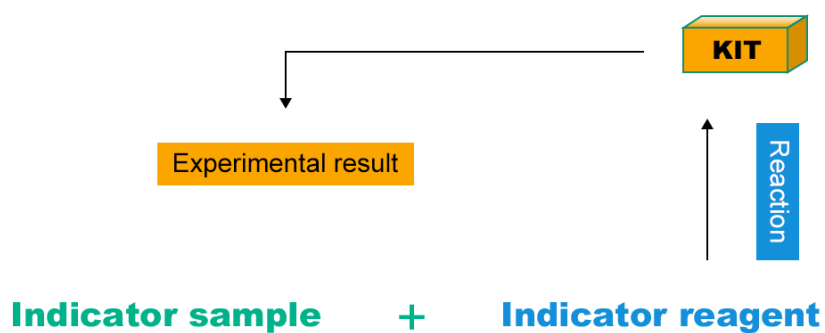


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0348

Size: 100T/48S

二胺氧化酶检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、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有色物质，在 500nm 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。

三、需自备的仪器和用品：

天平、低温离心机、可见分光光度计/酶标仪、96 孔板/玻璃比色皿、蒸馏水。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 70mL × 1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 0.25mL × 1 支	4℃保存	
试剂二	粉剂 × 1 瓶	4℃保存	使用时加 2mL 水溶解，4℃可保存 1 个月。
试剂三	液体 1mL × 1 支	4℃保存	

五、操作步骤：

● 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、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 500nm，蒸馏水调零。
- 2、操作表

	对照管	测定管
粗酶液 (μL)	50	50
提取液 (μL)	128	108
试剂一 (μL)	2	2
试剂二 (μL)	20	20
试剂三 (μL)		20
混匀，37℃水浴 30min，测定 500nm 吸光值。ΔA=A 测定-A 对照。		

六、酶活性计算公式：

● 使用 96 孔板测定的计算公式如下

1、动物组织 DAO 活力的计算

(1) 按蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生 $1\ \mu\text{mol}$ 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO (U/mg prot)} = \Delta A \div d \div \varepsilon \times V_{\text{反总}} \div (\text{cpr} \times V_{\text{样本}}) \div T = 30 \times \Delta A \div \text{cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化产生 $1\ \mu\text{mol}$ 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO (U/g 鲜重)} = \Delta A \div d \div \varepsilon \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 30 \times \Delta A \div W$$

2、血清（浆）DAO 活力的计算

单位的定义：每 mL 血清（浆）在反应体系中每分钟催化产生 $1\ \mu\text{mol}$ 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO (U/L)} = \Delta A \div d \div \varepsilon \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样本}} \div T = 30 \times \Delta A$$

3、按细胞数量计算：

单位的定义：每 10^4 个细胞在反应体系中每分钟催化产生 $1\ \mu\text{mol}$ 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (U/10}^4\text{cell)} = \Delta A \div d \div \varepsilon \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \div T = 0.06 \times \Delta A$$

V 反总：反应总体积，0.2 mL；V 样本：加入粗酶液体积，0.05mL；V 提取，加入提取液体积，1mL；cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本鲜重，g；d：光径，0.6cm； ε ：氧化型邻联茴香胺消光系数， $7.5 \times 10^{-3}\text{ mL}/\mu\text{mol}/\text{cm}$ ；T：反应时间，30min。

● 使用比色皿测定的计算公式如下

1、动物组织 DAO 活力的计算

(1) 按蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生 1 μmol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO (U/mg prot)} = \Delta A \div d \div \varepsilon \times V_{\text{反总}} \div (\text{cpr} \times V_{\text{样本}}) \div T = 18 \times \Delta A \div \text{cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化产生 1 μmol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO (U/g 鲜重)} = \Delta A \div d \div \varepsilon \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 18 \times \Delta A \div W$$

2、血清（浆）DAO 活力的计算

单位的定义：每 mL 血清（浆）在反应体系中每分钟催化产生 1 μmol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO (U/L)} = \Delta A \div d \div \varepsilon \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样本}} \div T = 18 \times \Delta A$$

3、按细胞数量计算：

单位的定义：每 10^4 个细胞在反应体系中每分钟催化产生 1 μmol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。 $\text{DAO 活性 (U/}10^4\text{cell)} = \Delta A \div d \div \varepsilon \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \div T = 0.036 \times \Delta A$

$V_{\text{反总}}$ ：反应总体积，0.2 mL； $V_{\text{样本}}$ ：加入粗酶液体积，0.05mL； $V_{\text{提取}}$ ，加入提取液体积，1mL； cpr ：样本蛋白浓度，mg/mL； W ：样本鲜重，g； d ：光径，1cm； ε ：氧化型邻联茴香胺消光系数， $7.5 \times 10^{-3} \text{ mL} / \mu\text{mol} / \text{cm}$ ； T ：反应时间，30min。

七、注意事项：

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