

## 二胺氧化酶（Diamine Oxidase, DAO）试剂盒说明书

（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-氨基氨替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°C保存	
试剂一	液体 5mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 13mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	粉剂 mg×1 支	4°C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°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（10<sup>4</sup>）：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°C）。

③ 在 96 孔板中依次加入：

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

【注】 若 $\Delta A$  差值较小，则需增加样本量 V1（如增至 40 $\mu\text{L}$ ，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。

$$\text{DAO}(\Delta\text{OD}_{510}/\text{min}/\text{mg prot})=\Delta A\div(V1\times\text{Cpr})\div 0.01\div T=166.7\times\Delta A\div\text{Cpr}$$

### 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。

$$\text{DAO 活性}(\Delta\text{OD}_{510}/\text{min}/\text{g 鲜重})=\Delta A\div(W\times V1\div V)\div 0.01\div T=166.7\times\Delta A\div W$$

### 3、按细胞数量计算：

酶活定义：每 10<sup>4</sup> 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。

$$\text{DAO 活性}(\Delta\text{OD}_{510}/\text{min}/10^4\text{cell})=\Delta A\div(500\times V1\div V)\div 0.01\div T=0.34\times\Delta A$$

### 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。

$$\text{DAO 活性}(\Delta\text{OD}_{510}/\text{min}/\text{mL})=\Delta A\div V1\div 0.01\div T=166.7\times\Delta A$$

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。