

二胺氧化酶（DAO）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：AC10279

规格：50T/24S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 30 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 3 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 40 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	液体 10 mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	液体 140 μL×1 支	2-8°C保存

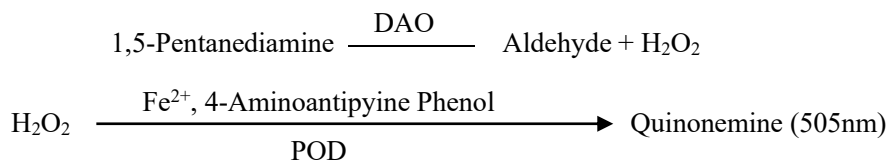
溶液的配制：

1. 标准品：临用前取 102 μL 加入 898μL 蒸馏水得到 1mol/L（即 1000μmol/mL）的过氧化氢溶液，2-8°C保存 4 周。
2. 0.25μmol/mL 标准溶液的配制：取 10μL 1000μmol/mL 标准液和 990μL 蒸馏水混合配成 10μmol/mL 标准液；再取 25μL 10μmol/mL 标准液和 975μL 蒸馏水混合配成 0.25μmol/mL 标准溶液备用。

产品说明：

DAO（EC1.4.3.6）广泛存在于动物（肠黏膜、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质合成密切相关，能够反映肠道机械屏障的完整性和受损程度。

DAO 催化尸胺产生醛和过氧化氢，H₂O₂ 氧化亚铁氰化钾中的 Fe²⁺生成 Fe³⁺，Fe³⁺进一步与 4-氨基安替比林和酚反应生成红色醌类化合物，在 505nm 处有特征吸收峰，通过测定 505nm 处的吸光值来计算 DAO 的活性。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 细胞或细菌：收集细胞或细菌到离心管内，离心后弃上清；按照细胞/细菌数量（10⁴）个：提取液体积（mL）为 500 ~1000：1 的比例（建议 500 万细胞/细菌加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞/细菌（功率 300W，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；10000g，4°C离心 20min，取上清置冰上待测。

- 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；10000g，4℃离心 20min，取上清置冰上待测。
- 血清（浆）等液体：直接检测，若溶液有浑浊则离心后取上清进行测定。

二、测定步骤

1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 505nm，蒸馏水调零。

2、操作表：（在 1.5mL EP 管中依次加入下列试剂）

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	225	225	-	-
标准品	-	-	225	-
试剂一	90	-	-	-
试剂二	600	600	600	600
试剂三	120	120	120	120
蒸馏水	-	90	90	315

涡旋混匀，37℃水浴或恒温培养箱中准确反应 1h。10000g，4℃离心 10min，取上清液于 1mL 玻璃比色皿，测定 505nm 处吸光值 A，分别记为 A 测定管、A 对照管、A 标准管、A 空白管。计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管， ΔA 标准=A 标准管-A 空白管。每个测定管需设一个对照管，标准管和空白管只需测 1-2 次。

三、DAO活性计算

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每小时每 mg 组织蛋白分解尸胺产生 1μmol 的 H₂O₂ 定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (U/mg prot)} = C \text{ 标准} \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times V \text{ 样本} \div (Cpr \times V \text{ 样本}) \div T \times F$$

$$= 0.25 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div Cpr \times F$$

(2) 按样本质量计算：

单位的定义：每小时每 g 组织分解尸胺产生 1μmol 的 H₂O₂ 定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (U/g 质量)} = C \text{ 标准} \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times V \text{ 提取} \div W \div T \times F = 0.25 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times F$$

(3) 按细胞/细菌数量计算：

单位的定义：每小时每 10⁴ 个细胞/细菌分解尸胺产生 1μmol 的 H₂O₂ 定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = C \text{ 标准} \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times V \text{ 提取} \div N \div T \times F = 0.25 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div N \times F$$

(4) 按液体体积计算：

单位的定义：每小时每 mL 液体分解尸胺产生 1μmol 的 H₂O₂ 定义为一个酶活力单位。

$$\text{DAO 活性 (U/mL)} = C \text{ 标准} \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times V \text{ 样本} \div V \text{ 样本} \div T \times F = 0.25 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times F$$

C 标准：标准溶液浓度，0.25μmol/mL；V 提取：提取液体积，1mL；V 样本：加入反应体系中样本体积，0.225mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL，需自行测定；W：样本质量，g；N：细胞数量，以 10⁴ 计；T：反应时间，1h；F：稀释倍数。

实验实例：

- 称取 0.1009g 竹叶样本，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆，10000g 4℃离心 20min，取上清置冰上待测，之后按照测定步骤，用 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管=1.553-0.638=0.915， ΔA 标准=A 标

准管-A 空白管=0.353-0.059=0.294; 按样本质量计算酶活得:

DAO 活性(U/g 质量) = $0.25 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F = 7.711 \text{ U/g 质量}$

2. 称取 0.1000g 十二指肠样本, 加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆, 10000g 4°C离心 20min, 取上清置冰上待测, 之后按照测定步骤, 用 1mL 玻璃比色皿测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.363 - 0.251 = 0.112$, $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}} = 0.353 - 0.059 = 0.294$; 按样本质量计算酶活得:

DAO 活性(U/g 质量) = $0.25 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F = 0.952 \text{ U/g 质量}$

相关系列产品:

AC10071/AC10072 丙二醛 (MDA) 含量检测试剂盒

AC10188/AC10189 葡萄糖氧化酶 (GOD) 活性检测试剂盒

AC10240/AC10241 黄嘌呤氧化酶 (XOD) 活性检测试剂盒

AC10236/AC10278 蛋白质羰基含量检测试剂盒