

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K524-M

产品规格: 96T(40 samples)

检测仪器: 酶标仪(450-470 nm)

Elabscience®二胺氧化酶(DAO)比色法测试盒

Diamine Oxidase (DAO) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清(浆)、尿液、动物组织及细胞样本中二胺氧化酶(DAO)的活力。

检测原理

二胺氧化酶(DAO,E.C.1.4.3.6)广泛存在于动物组织(肠粘膜、肺、肝脏、肾脏等)、血清血浆及细胞中,是人类和哺乳动物小肠粘膜上层绒毛中具有高度活性的细胞内酶,它可通过调节细胞内的离子平衡、影响传导通路、促进细胞修复。本试剂盒检测原理为二胺氧化酶可催化胺类物质产生过氧化氢,过氧化氢可使显色物质显色,该显色物质在460 nm处有特征吸收峰,通过测定单位时间内吸光度的变化速率计算出二胺氧化酶的活力。

本试剂盒测定组织或细胞样本时,需测定总蛋白浓度,推荐使用本公司BCA试剂盒(货号E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格(Size)(96 T)	保存方式(Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	60 mL×1 瓶	2-8℃ 保存6个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	1.5 mL×2 支	2-8℃避光 保存6个月
试剂三 (Reagent 3)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	粉剂×1 支	2-8℃避光 保存6个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 (Chromogenic Agent)	粉剂×1 支	2-8℃避光 保存6个月
试剂五 (Reagent 5)	终止剂 (Stop Agent)	10 mL×1 瓶	2-8℃ 保存6个月
试剂六 (Reagent 6)	100 mmol/L 标准品 (100 mmol/L Standard)	1 mL×1 支	2-8℃避光 保存6个月
	96 孔酶标板	1 板	
	96 孔覆膜	2 张	

	样本位置标记表	1 张	
--	---------	-----	--

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(450-470 nm，最佳检测波长 460 nm)，恒温箱(37 ℃)、匀浆机、低温离心机

试剂准备

① 检测前，将试剂三置于冰盒上，其余试剂平衡至室温。

② 试剂三储备液配制：

取一支试剂三加入1.5 mL双蒸水溶解，避光，未用完部分2-8 ℃可保存7天。

③ 试剂三反应工作液配制：

按试剂三储备液：试剂一=1: 9的体积比混匀，现配现用，按需配制，置于冰盒上避光待用，当天使用完毕。

④ 试剂四工作液配制：

取一支试剂四加入1.9 mL双蒸水溶解，2-8 ℃避光保存，未用完部分2-8 ℃可保存7天。

⑤ 5 mmol/L标准品溶液配制：

将试剂六与双蒸水按照1：19体积比进行稀释，按需配制，2-8 ℃避光保存7天。

⑥ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	0	0.2	0.5	0.7	1.0	1.2	1.5	2.0
5 mmol/L 标准品(μL)	0	8	20	28	40	48	60	80
双蒸水(μL)	200	192	180	172	160	152	140	120

样本准备

① 样本处理

血清(浆)样本：直接测定，若样本较浑浊，需要先离心，取上清进行测定。

组织样本：匀浆液为试剂一，匀浆后的上清一部分用于蛋白测定。

细胞样本：按细胞数量 2×10^6 ：试剂一体积 200 μL 的比例进行匀浆，4 $^{\circ}\text{C}$ 10000 $\times g$ ，离心 10 min 取上清待测，匀浆后的上清一部分用于蛋白测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：7.39-134.15 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	2-4	人血浆	不稀释
大鼠血清	不稀释	大鼠血浆	不稀释
小鼠血清	不稀释	小鼠血浆	不稀释
10%大鼠肝组织	不稀释	10%大鼠肾组织	不稀释
10%大鼠心组织	不稀释	人尿液	不稀释
Hela 细胞(1×10^6)	不稀释		

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

① 加试剂五时慢吸慢打，若出现气泡，检测之前需用移液枪吹打排净气泡。

② 加完试剂五检测体系如有浑浊，可混匀体系。

③ 若试剂五有固态物质，可 60 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 至澄清。

操作步骤

- ① 标准孔：取 20 μL 不同浓度的标准品，加入到酶标板各标准孔中；
对照孔：取 20 μL 待测样本，加入到酶标板各对照孔中。
测定孔：取 20 μL 待测样本，加入到酶标板各测定孔中。
- ② 向步骤①各孔加入 20 μL 试剂二。
- ③ 向步骤②各孔加入 100 μL 试剂三反应工作液。
- ④ 向步骤③的对照孔加入 30 μL 双蒸水，向标准孔和测定孔加入 30 μL 试剂四工作液。
- ⑤ 混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。
- ⑥ 向步骤⑤各酶标孔加入 50 μL 试剂五(注意慢吸慢打，避免产生大量气泡)。
- ⑦ 混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min，酶标仪 460 nm 处测定各孔 OD 值(若体系产生气泡，检测前需用移液枪吹打排净气泡再进行测定)。

操作表

	标准孔	对照孔	测定孔
标准品(μL)	20		
待测样本(μL)		20	20
试剂二(μL)	20	20	20
试剂三反应工作液(μL)	100	100	100
双蒸水(μL)		30	
试剂四工作液(μL)	30		30
混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min			
试剂五(μL)	50	50	50
混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min，酶标仪 460 nm 处测定各孔 OD 值。			

本试剂盒检测组织或细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

组织和细胞样本中 DAO 酶活:

定义: 37℃ 条件下, 每克组织蛋白每分钟水解底物生成 1 μmol 产物所需要的 DAO 酶活为一个活力单位。

$$\text{DAO 活力} \frac{\Delta A_{460} - b}{a} \div C_{\text{pr}} \div T \times f \times 1000^*$$

(U/gprot)

血清血浆中 DAO 酶活:

定义: 37℃ 条件下, 每升血清/血浆样本每分钟水解底物生成 1 μmol 产物所需要的 DAO 酶活为一个活力单位。

$$\text{DAO 活力} \frac{\Delta A_{460} - b}{a} \div T \times f \times 1000^*$$

(U/L)

注解:

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔA_{460} : 460 nm 波长处样本测定 OD 值-对照 OD 值

T: 孵育反应时间, 30 min

C_{pr} : 待测样本蛋白浓度: gprot/L

f: 加入检测体系前样本稀释倍数

1000*: 1 mmol/L = 1000 $\mu\text{mol/L}$

附录1 关键数据

1. 技术参数

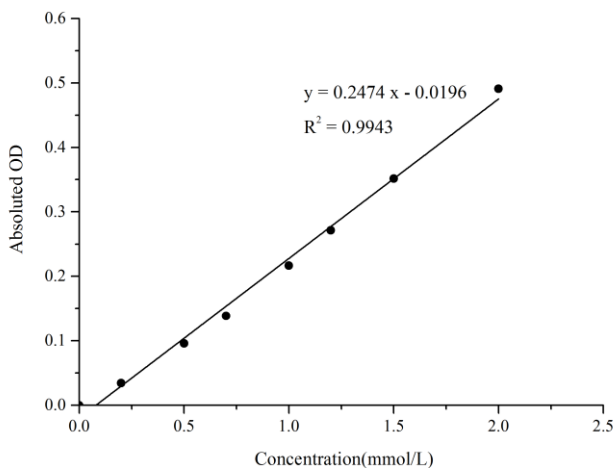
检测范围	7.39-134.15 U/L	平均批间差	7.0 %
灵敏度	7.39 U/L	平均批内差	5.0 %
平均回收率	105 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量20 μ L，按照操作步骤进行实验，各管OD值如下表所示：

标准品浓度 (mmol/L)	0	0.2	0.5	0.7	1.0	1.2	1.5	2.0
OD 值	0.065	0.098	0.161	0.198	0.280	0.336	0.413	0.556
	0.064	0.100	0.160	0.208	0.282	0.336	0.419	0.555
平均 OD 值	0.065	0.099	0.161	0.203	0.281	0.336	0.416	0.556
绝对 OD 值	0.000	0.035	0.096	0.139	0.217	0.272	0.352	0.491

②制标准曲线，如下图所示：



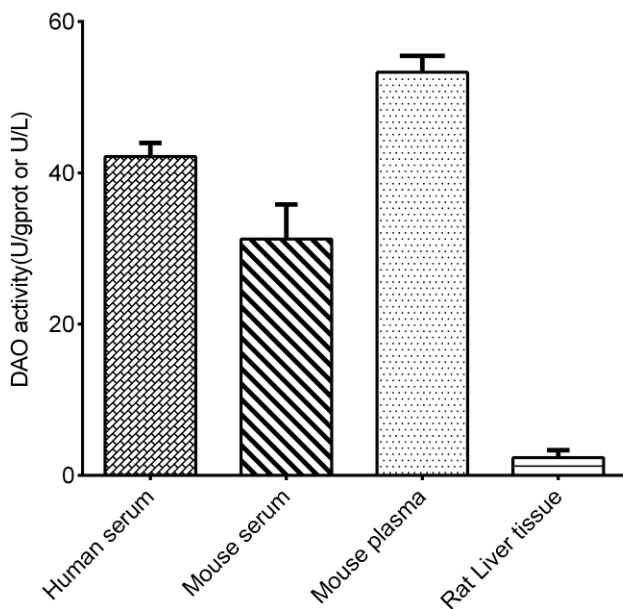
附录2 实例分析

例如检测人血清样本(数据仅供参考):

取20 μL 稀释2倍的人血清样本,按说明书操作步骤进行检测,其结果为:
标准曲线: $y = 0.2474x - 0.0196$, 对照孔平均OD值为0.058, 测定孔平均OD
值为0.194, 二胺氧化酶活计算结果为:

$$\text{DAO 活力} = \frac{(0.194 - 0.058) + 0.0196}{0.2474} \div 30 \times 2 \times 1000 = 41.93 \text{ U/L}$$

按照说明书操作,测定人血清(加样量20 μL , 稀释2倍)、小鼠血清(加样量20 μL)和小鼠血浆(加样量20 μL)和大鼠肝组织(10%匀浆蛋白浓度为10.73 gprot/L, 加样量20 μL)中DAO活力(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
检测体系浑浊	样本浓度较大	参考说明书对样本进行稀释
复孔差较大	反应体系产生较多气泡	检测前排净气泡

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Zhang X, He C, Chen Y, et al. Cyclic reactions-mediated self-supply of H₂O₂ and O₂ for cooperative chemodynamic/starvation cancer therapy[J]. *Biomaterials*, 2021, 275:120987-. IF:12.479
2. Xia H, Scholtes C, Dufour CR, et al. Insulin action and resistance are dependent on a GSK3 β -FBXW7-ERR α transcriptional axis. *Nat Commun*. 2022; 13 (1):2105. IF:14.919
3. Liu Q, Zhang T X, Zheng Y D, et al. Calixarene-Embedded Nanoparticles for Interference-Free Gene-Drug Combination Cancer Therapy[J]. *Small*, 2021, 2006223. IF:11.459
4. He C, Zhang X, Chen C, et al. A solid lipid coated calcium peroxide nanocarrier enables combined cancer chemo/chemodynamic therapy with O₂/H₂O₂ self-sufficiency[J]. *Acta Biomaterialia*, 2021, 122. IF:8.203
5. Chen L, Tao F, Zhang Y, et al. Islet-cell autoantigen 69 accelerates liver regeneration by downregulating Tgfb1 and attenuating Tgf β signaling in mice[J]. *FEBS Letters*, 2020, 594(17). IF:6.665
6. Omar N, Frank J, Kruger J, et al. Effects of High Intakes of Fructose and Galactose, with or Without Added Fructooligosaccharides, on Metabolic Factors, Inflammation, and Gut Integrity in a Rat Model[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2021:2001133. IF:5.914
7. Wang C, Ma C, Fu K, et al. Phillygenin Attenuates Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis via Modulating Inflammation and Gut Microbiota[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 9, 21. IF:5.81
8. Du Y Q, Zheng Y Z, Yu C X M, et al. The Mechanisms of Yu Ping Feng San in Tracking the Cisplatin-Resistance by Regulating ATP-Binding Cassette Transporter and Glutathione S-Transferase in Lung Cancer Cells[J].*Frontiers in Pharmacology*, 2021; 12: 678126. IF:5.81
9. Zeng X Peng, Wang L J, Guo L H, et al. Dasatinib ameliorates chronic pancreatitis induced by caerulein via anti- fibrotic and anti-inflammatory mechanism[J]. *Pharmacological Research*, 2019, 147, 104357. IF:5.574
10. Cao X, Liang Y, Liu R, et al. Uncovering the Pharmacological Mechanisms of Gexia-Zhuyu Formula (GXZY) in Treating Liver Cirrhosis by an Integrative Pharmacology Strategy. *Front Pharmacol*. 2022; 13:793888. IF:5.331
11. Wang Y, Xie W, Feng Y, et al. Epithelial-derived exosomes promote M2 macrophage

- polarization via Notch2/SOCS1 during mechanical ventilation. *Int J Mol Med.* 2022; 50 (1). IF:5.314
12. Jung D S, Son Y J, Shin J M, et al. Gymnaster Koraiensis Extract Alleviated Metabolic Syndrome Symptoms and Stimulated UCP1-Independent Energy Consumption via AMPK Activation in White Adipose Tissue[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2020. IF:5.309
 13. Ali A K, Komal A K, Almutairi S M, et al. Natural killer cell-derived IL-10 prevents liver damage during sustained murine cytomegalovirus infection[J]. *Frontiers in immunology*, 2019, 10: 2688. IF:5.085
 14. Xu Y , Zhang Y , Xu Y , et al. Activation of CD137 signaling promotes macrophage apoptosis dependent on p38 MAPK pathway-mediated mitochondrial fission[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2021 Jul;136:106003. IF:5.085
 15. Naseh A, Shirin B, Maryam M, et al. Attenuation of chronic arsenic neurotoxicity via melatonin in male offspring of maternal rats exposed to arsenic during conception: Involvement of oxidative DNA damage and inflammatory signaling cascades[J]. *Life Sciences* 266 (2021) 118876. IF:5.037
 16. Ahmed A E, Alshehri A, Al-Kahtani M A, et al. Vitamin E and selenium administration synergistically mitigates ivermectin and doramectin-induced testicular dysfunction in male Wistar albino rats[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 124: 109841. IF:4.545
 17. Su S, Tian H, Jia X, et al. Mechanistic insights into the effects of SREBP1c on hepatic stellate cell and liver fibrosis[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020. IF:4.486
 18. Wang L J, He L, Hao L, et al. Isoliquiritigenin ameliorates caerulein-induced chronic pancreatitis by inhibiting the activation of PSCs and pancreatic infiltration of macrophages[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020. IF:4.486
 19. Dejan Lazić, Andreas Scheurer, Dušan Čočić, et al. New bis-pyrazolopyridine ruthenium(III) complex as a potential anticancer drug: In vitro and in vivo activity in murine colon cancer[J]. *Dalton Transactions*, 2021 Jun; 50(22):7686-7704. IF:4.39
 20. Li X, Lv Z, Chen J, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* B10 can alleviate liver apoptosis and oxidative stress induced by aflatoxin B1[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2021, 151:112124. IF:4.06

