

腺苷脱氨酶(ADA)活性测定试剂盒

分光法 48 样

产品简介:

腺苷脱氨酶 (ADA, EC 3.5.4.4) 是一种巯基酶, 是嘌呤核苷酸代谢的关键酶, 与机体细胞的免疫活性有重要关系。腺苷脱氨酶 (ADA) 催化腺嘌呤核苷水解, 产生次黄嘌呤核苷和氨, 利用氨在强碱的环境下与次氯酸盐和苯酚作用, 生成水溶性染料靛酚蓝, 溶液颜色稳定。

其在 630nm 处有特征吸收峰, 通过检测氨增加的速率, 即可计算该酶活性大小。

试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液 1	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 mg×2 瓶	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 每瓶再加 11mL 蒸馏水溶解备用。
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	液体 24mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	液体 12mL×1 瓶	4°C保存	
试剂六	A: 液体 7mL×4 瓶 B: 液体 μL×1 支	4°C保存	临用前取 60μL 的 B 液进一瓶 A 液中, 混匀后作为试剂六使用。混匀后的试剂六一周内用完。
标准管	液体 mL×1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、可调式移液枪、研钵、冰和蒸馏水。

腺苷脱氨酶 (ADA) 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 (水分足的样本可取 0.2-0.5g), 加入 1mL 提取液; 进行冰浴匀浆。

12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

[注]: 也可以按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例提取。

② 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 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 630nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C), 在 EP 管依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	80	80
试剂一	200	200
试剂二	200	
试剂三		200
混匀, 放入 37°C 水浴锅或恒温培养箱中孵育 30min。		
试剂二		200
试剂三	200	

混匀，室温 12000rpm 离心 10min，上清液待测。

③ 显色反应：在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
上清液 (上步反应)	60	60
蒸馏水	180	180
试剂四	240	240
试剂五	120	120
试剂六	240	240

充分混匀, 37°C 放置 20min 后, 全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 于 630nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ (每个样本做一个自身对照)。

[注]: 1. 试剂四和五和六需分开加, 不能事先混匀。

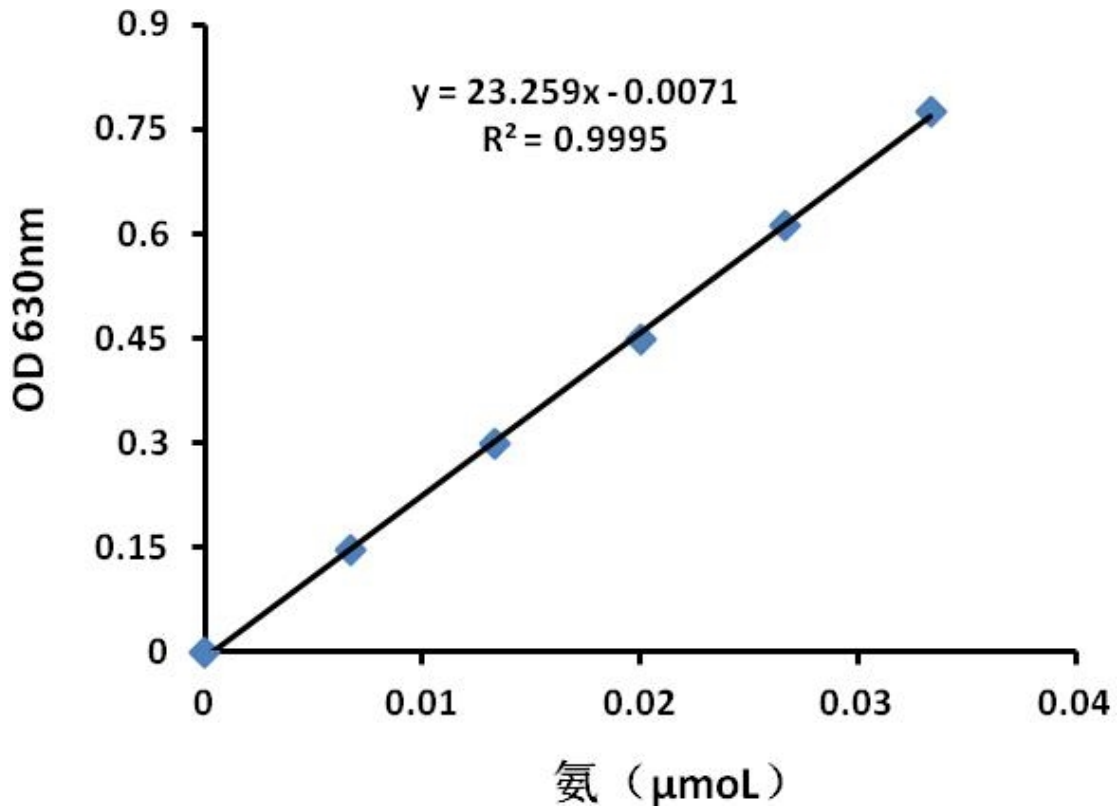
2. 若 ΔA 的值较小, 可增加 37°C 孵育时间 (如增至 1 小时或更长), 或在显色阶段增加上清液量 V1 (如增至 120μL, 则蒸馏水体积相应减少); 则改变后的 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

3. 若 A 测定大于 1.8, 可减少 37°C 孵育时间 (如减至 10min 或更短), 或在显色阶段减少上清液量 V1 (如减至 30μL, 则蒸馏水体积相应增加); 则改变后的 T 和 V1 需代入公式重新计算。

结果计算:

1、标准曲线方程:

$y = 23.259x - 0.0071$; x 为标准品摩尔质量 (μmol), y 为吸光值 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克蛋白质每小时催化腺苷生成 1μmol 氨定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ADA} (\mu\text{mol/h/mg prot}) &= (\Delta A + 0.0071) \div 23.259 \times (V2 \div V3) \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 12.2 \times (\Delta A + 0.0071) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每小时催化腺苷生成 1μmol 氨定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ADA} (\mu\text{mol/h/g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0071) \div 23.259 \times (V2 \div V3) \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 12.2 \times (\Delta A + 0.0071) \div W \end{aligned}$$

4、按照液体体积计算：

单位定义：每毫升液体每小时催化腺苷生成 1μmol 氨定义为一个酶活力单位。

$$ADA (\mu\text{mol/h/mL}) = (\Delta A + 0.0071) \div 23.259 \times (V2 \div V3) \div V1 \div T = 12.2 \times (\Delta A + 0.0071)$$

V---提取液体积, 1mL; V1----加入②步反应体系中样本体积, 0.08mL;

V2---②步反应体系总体积: 0.68mL; V3---③步显色步骤中上清液体积, 0.06mL;

T---反应时间, 0.5h; W---样本质量;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

1. 标准品母液 (10 $\mu\text{g/mL}$ 的氨 (分子量是 18)), 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 2, 4, 6, 8, 10 $\mu\text{g/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
2. 按照显色反应阶段的测定管加样体系操作, 根据结果即可制作标准曲线。