

腺苷脱氨酶 (Adenosine deaminase, ADA)活性测定试剂盒说明书

(货号: BP10377F 分光法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 22mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 2 瓶	-20℃避光保存	每瓶: 1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 每瓶加入 11mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 22mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 25mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂五	液体 14mL×1 瓶	4℃保存	
试剂六	A: 液体 7mL×4 瓶 B: 液体 1 支	4℃避光保存	1. 临用前取 60μL 的 B 液进一瓶 A 液中, 混匀后作为试剂六使用; 2. 混匀后的试剂六一周内用完。
标准管	液体 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

1、样本提取:

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℃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、检测步骤:

① 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℃), 在 EP 管依次加入:

试剂组分 (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℃ 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：

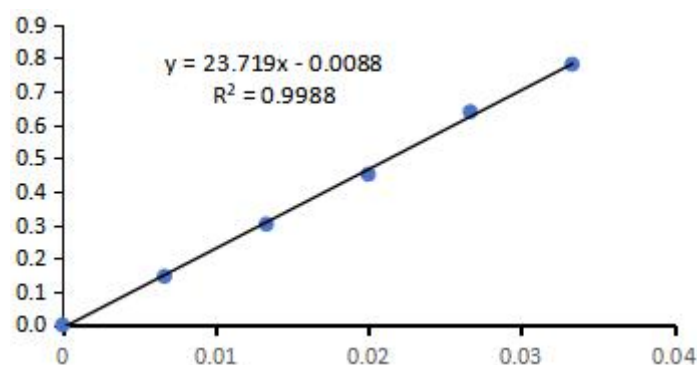
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
上清液 (上步反应)	60	60
蒸馏水	180	180
试剂四	240	240
试剂五	120	120
试剂六	240	240
充分混匀，37℃ 放置 20min 后，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中，于 630nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

【注】1. 试剂四和五和六需分开加，不能事先混匀。

- 若 ΔA 的值较小，可增加 37℃ 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 V_1 (如增至 120μL，则蒸馏水体积相应减少)；则改变后的 T 和 V_1 需代入计算公式重新计算。
- 若 A 测定大于 1.8，可减少 37℃ 孵育时间 (如减至 10min 或更短)，或在显色阶段减少上清液量 V_1 (如减至 30μL，则蒸馏水体积相应增加)；则改变后的 T 和 V_1 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 $y = 23.719x - 0.0088$ ；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。

$$\text{ADA } (\mu\text{mol/h/mg prot}) = (\Delta A + 0.0088) \div 23.719 \times (V_2 \div V_3) \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T$$

$$= 11.9 \times (\Delta A + 0.0088) \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$\text{ADA } (\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = (\Delta A + 0.0088) \div 23.719 \times (V_2 \div V_3) \div (W \times V_1 \div V) \div T$$

$$= 11.9 \times (\Delta A + 0.0088) \div W$$

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。

$$\text{ADA } (\mu\text{mol/h/mL}) = (\Delta A + 0.0088) \div 23.719 \times (V_2 \div V_3) \div V_1 \div T = 11.9 \times (\Delta A + 0.0088)$$

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 标准品母液为 10 μ g/mL 的氨 (分子量是 18)。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 2, 4, 6, 8, 10. μ g/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下:

标品浓度 μ g/mL	0	2	4	6	8	10
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据显色反应阶段测定管的加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	60	
蒸馏水	180	240
试剂四	240	240
试剂五	120	120
试剂六	240	240
充分混匀, 37 $^{\circ}$ 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, $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		