

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

(货号: G0438F 分光法 48 样)

一、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。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 mg×2 瓶	4℃保存	临用前用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℃保存	
试剂四	液体 24mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	
试剂六	A: 液体 7mL×4 瓶 B: 液体 μL×1 支	4℃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℃保存	若重新做标曲, 则用到该标曲。

三、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。

四、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, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费!

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℃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 细菌/细胞样本: 先收集细菌到离心管内, 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℃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 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行。

- 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 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℃), 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℃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）。

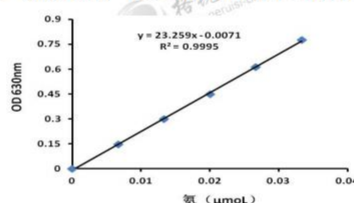
【注】1. 试剂四和五和六需分开加，不能事先混匀。

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。

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 $y = 23.259x - 0.0071$ ；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。

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

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。

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

4、按细胞数量计算：

单位定义：每 10⁴ 个细胞每小时催化腺苷生成 1μmol 氨定义为一个酶活力单位。

$$ADA (\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A + 0.0118) \div 58.121 \times (V2 \div V3) \div (500 \times V1 \div V) \div T = 9.75 \times (\Delta A + 0.0118) \div 500$$

5、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，g； 500---细胞数量，万；

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（10μg/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 μg/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。