天净沙系列

CAT#:7-EC1.4.1.1

低温运输，-20℃保存

天净沙

丙氨酸脱氢酶活性测定试剂盒（340 nm 光度法）

Alanine Dehydrogenase Assay Kit

使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品用于测定丙氨酸脱氢酶（Alanine Dehydrogenase，ALD，EC1.4.1.1）活性。其原理是丙氨酸脱氢酶催化底物 L-丙氨酸与 NAD^+反应生成 NADH，NADH 在 340 nm 处有特征光吸收，故通过监测 NADH 在 340 nm 处吸光度随时间的增加量（ΔA340/min）即可计算酶活性。本产品具有如下特点：

1. 即开即用，使用便捷，用户不需要优化条件，只需准备待测样本。
2. 最低检测限为 0.0018 U，线性范围在 0.0009 U-0.0136 U 之间。
3. 本试剂盒 1 个酶活性单位的定义是在 25℃ pH 10.0 的条件下，每分钟能催化 1 μmol 底物转化所需的酶量。由于 1 个丙氨酸脱氢酶底物分子的转化将产生 1 个 NADH 分子，故 1 个酶活性单位相当于在 25℃ pH 10.0 的条件下每分钟催化 1 μmol NADH 产生所需的酶量。
4. 本产品足够 100 次 1 mL 体系的比色皿检测或 400 次 250 μL 体系的 96 孔板检测。
5. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品采用塑料袋包装

成份	编号	规格	包装
丙氨酸脱氢酶 活性测定反应液	7-EC1.4.1.1r	120 mL	125 mL 本色瓶
丙氨酸脱氢酶底物干粉	7-EC1.4.1.1s	100 T	1.5 mL 本色管
NAD＋干粉	CAS:53-84-9	100 T	1.5 mL 棕色管
使用手册	7-EC1.4.1.1sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

自备试剂

待测样品，超纯水，蛋白浓度测定试剂盒，比色皿及与之匹配的分光光度计，96 孔板及与之匹配的分光光度计。

使用方法

一、首次使用本试剂盒时配制下列溶液

1. 配制底物辅酶混合液：在 1 个 100 mL 干净塑料瓶中，加入 98 mL 丙氨酸脱氢酶活性测定反应液（相当于 98 g），然后加入所有丙氨酸脱氢酶底物干粉和所有 NAD+干粉，颠倒 1 分钟混匀即得底物混合液。此溶液足够 100 次测定。可根据每次反应数分成小份，用锡箔纸包好（必须避光），放-20℃或更低温度保存，每次取用 1 份。

二、制备待测样本

2. 用自备试剂制备待测样品。注意：由于本试剂盒测定的是 NADH，故样本中也不得有 NADH 的成份。

3. 预留 10 mL 最后溶解样本的样本溶解液，作为后续测光吸收时的阴性对照。

4. 用自备试剂测定待测样本的蛋白浓度，以备后续计算比活时使用。

三、1 mL 体系 1 cm 光径比色皿测定

5. 如果有 N 个待测样本，每个只做一次重复，则标注 N+1 个试管，多出的一个用做阴性对照（空白对照）。

6. 在 25℃恒温条件下按下表进行加样，总体系为 1 mL:

成分	阴性对照管	N 个待测样品管
底物辅酶混合液	980 μL	各 980 μL
丙氨酸脱氢酶 活性测定反应液	20 μL	不加
待测样本	不加	各 20 μL

7. 加入最后成分后立即混匀并转移到比色皿中在在 340 nm 波长下测光吸收 A。每隔半分钟测一次，共测 3 分钟，每个管的样品将得到 6 个测定值。

四、数据处理

8. 丙氨酸脱氢酶活性单位的定义是在 25℃ pH 10.0 的条件下，每分钟能催化 1 μmol 底物所需的酶量，故按下面步骤计算出样本的△A/min，再将其换算成产物的μmol 数。

9. 计算△A/min 测定值：以时间为横轴，以样本不同时间点的 A 值为纵轴，选择 A 值呈线状的区域计算△A/min，此为测定值。空白样本（阴性对照管）也需要计算。

10. 计算△A/min 真实值：样本△A/min 测定值-空白样本△A/min 测定值=样本△A/min 真实值。

11. 将△A 换算成所测产物浓度变化：根据朗伯-比尔定律△A=εlc=消光系数*光径*浓度，则浓度=△A/（消光系数*光径）。代入 NADH 在 340 nm 的消光系数 6300 L/cm*mol 和比色皿光径 1 cm，则浓度=△A/[（6300 L/cm*mol）*1 cm] =（△A/6300）mol/L=（△A/6.3）μmol/mL。注：绝大部分比色皿是 1 cm，如果所用比色皿不是则改成实际光径。

12. 将产物浓度换算μmol 数和酶单位数：本检测反应体积为 1 mL，故底物μmol 数=浓度*1 mL=[（△A/6.3）μmol/mL]*1 mL=（△A*1/6.3）μmol。根据酶单位定义，则丙氨酸脱氢酶的单位数=产物μmol 数=（△A/6.3）U。

13. 计算样本中的酶浓度：由于加入到 1 mL 反应体系中的样本体积为 0.02 mL，故在样本中的浓度为（△A/6.3）U/0.02 mL=（△A*50/6.3）U/mL。

14. 计算样本的酶比活性：样本总体积乘以酶浓度 U/mL 即得样本总酶单位数

	U，样本总体积乘以其蛋白浓度即得样本总蛋白量（以 mg 为单位），样本酶比活（U/mg）=总酶单位数/总蛋白量。 **五、多孔板酶标仪检测** 15. 操作同上，只是在设置反应时，各成份的用量降低 75%，只用 25%，计算时体积不是 1 mL，而是 0.25 mL。同时光径不是 1 cm，要根据所用 96 孔板修改（需要咨询厂家）。消光系数不变。
关联产品	蛋白浓度测定试剂盒（BCA 法）