天净沙系列

CAT#:7-C141-46-8

低温运输，2-8℃保存

天净沙

羟乙醛含量测定试剂盒

Glycolaldehyde Assay Kit

使用手册 V0.51

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

本产品用于测定羟乙醛（Glycolaldehyde，GA，CAS 141-46-8）含量。其原理是GA 在醇脱氢酶（Alcohol Dehydrogenase，ADH，EC1.1.1.1，CAS 9031-72-5）的作用下与 NADH 反应生成 NAD+。由于前者在 340 nm 处有特征光吸收，故通过监测吸光度在 340 nm 处的降低，即可计算出样本中 GA 含量。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. 提供 GA 阳性对照，便于在遇到问题时分析原因。
3. 适用于检测从各种样本中提取的，或合成的 GA。
4. 灵敏度高，最低检测限为 133 μM。
5. 可以定量，线性范围在 313 μM -10 mM 之间。
6. 提供标准曲线法和消光系数法两种操作流程。
7. 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。
8. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品采用小扁盒包装

成份	编号	规格	包装
GA 测定液	7-C141-46-8r	100 mL	120 mL 本色瓶
ADH 干粉	CAS 9031-72-5	100 T	2.0 mL 红盖管
ADH 储存液	5-C9031-72-5	3 mL	5 mL 本色瓶
NADH 干粉	CAS 606-68-8	100 T	0.5 mL 本色管
10 mM GA 标曲液	7-C141-46-8sd	1 mL	1.5 mL 本色管
使用手册	7-C141-46-8sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，2-8℃保存，有效期一年。

自备试剂

待测样品，样本溶解液，超纯水，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需配制下列溶液。

1. 配制 ADH 溶液：将 2 mL ADH 储存液加入到装有 ADH 干粉的管中，颠倒摇晃 20 次溶解，得 2 mL ADH 溶液，放冰上待用。剩下的 1 mL ADH 储存液也放冰上待用。
2. 配制含 NADH 的 GA 测定液：从装有 100 mL GA 测定液的瓶中取出 10 mL 到新的离心管或试剂瓶中待用，再将 NADH 干粉全部加入到剩余的 90 mL GA 测定液中，颠倒摇晃 20 次溶解，得含 NADH 的 GA 测定液，放冰上待用。
3. 如果一次实验没有用完上述溶液，需要放-20℃或更低温度保存。

二、制备待测样本

4. 用自备试剂制备待测样品。待测样本的 pH 必须在 7.4，否则可能会改变反应体系的

pH；待测样本中不得含 EDTA、EGTA 和吡唑及其衍生物等物质，也不能含有 Hg2+、Cu2+、Ag+、Pb2+等金属离子，因为它们会抑制 ADH 酶活性；样本中也不得含有不得含有能生成或降解 NADH 的酶。

三、标曲制备（以 6 个浓度梯度的 GA 标曲液为例）

5. 标记 0-6 号共 7 个 1.5 mL 离心管，并在 0-5 号管中加入 0.2 mL 第 2 步留存的未加 NADH 的 GA 测定液，只 6 号管不加。
6. 在 6 号管中加入 0.2 mL 试剂盒提供的 10 mM GA 标曲液。
7. 在 5 号管中也加入 0.2 mL 试剂盒提供的 10 mM GA 标曲液，充分震荡 1 分钟，由于管中已经有 0.2 mL GA 测定液，故得 5 mM GA 标曲液。
8. 在 4 号管中加入 0.2 mL 5 号管中的 GA 标曲液，充分震荡 1 分钟，得 2.5 mM GA 标曲液。
9. 在 3 号管中加入 0.2 mL 4 号管中的 GA 标曲液，充分震荡 1 分钟，得 1.25 mM GA 标曲液。
10. 重复上面的操作直到得到 1 号管的 GA 标曲液。0 号管不需要加入 1 号管的 GA 标曲液，故只有在第 5 步加入的 GA 测定液。最后，0-6 号管中溶液的 GA 浓度分别为 0、313 μM、625 μM、1.25 mM、2.5 mM、5 mM 和 10 mM。放冰上待用。
11. 将分光光度计开机，预热 30 分钟后用超纯水调零。
12. 按下表设置反应：

成分	7 个标曲管
含 NADH 的 GA 测定液 （来于第 2 步）	各 880 μL
7 个 GA 标曲液 （来于第 10 步）	各 100 μL 到对应管
ADH 溶液 （来于第 1 步）	各 20 μL

13. 加酶后快速混匀 30 秒后放 30℃反应 30 分钟，然后测定每个样本在 340 nm 的光吸收（以下全部简称为 A 值）。
14. 数据处理：将 1-6 号的 A 值分别减去 0 号的 A 值即得各样本的真实 A 值。
15. 绘制标曲：以 1-6 号 GA 标曲液的浓度（单位为μM）为横轴，以每个样本的 A 值为纵轴，绘制标准曲线并得到标曲方程式 C=a*A+b。C 为 GA 浓度（单位为μM），A 为 A 值。
16. 此公式可在后续计算中使用，不需要每次再做标曲，但必须在后续实验中设置 1-2 个质控点样本随待测样本一起测试。质控点样本的 GA 浓度必须在标曲 GA 浓度的线性范围内，并且最好跟上述 7 个 GA 标曲液的浓度不同。此浓度称为配制浓度。测试后

将质控点样本的 A 值代入到标曲公式得到其计算浓度。如果质控点样本的计算浓度和其配制浓度差异在 10%以内，则可以用标曲公式计算其余待测样本。如果差异大于 10%，则需在测试待测样本时同步制备新的标曲。

四、样本测定

17. 设置反应：在 1.5 mL 离心管中按下表分别加入各成份：

成分	1-2 个 质控点管	N 个待测样本 无酶对照管	N 个待测 样本管
含 NADH 的 GA 测定液 （来于第 2 步）	880 μL	各 880 μL	各 880 μL
1-2 个质控点样本	各 100 μL	不加	不加
自备 N 个待测样本	不加	各 100 μL	各 100 μL
ADH 储存液 （来于第 1 步）	不加	各 20 μL	不加
ADH 溶液 （来于第 1 步）	20 μL	不加	各 20 μL

18. 加酶后快速混匀 30 秒后放 30℃反应 30 分钟，再测定每个样本在 340 nm 的 A 值。

五、数据处理

19. 计算真实 A 值：将各样本的 A 值减去所对应的无酶对照样本的 A 值，即得各样本的真实 A 值。

20. 将真实 A 值导入到 C=a*A+b 公式中，即可计算出样本中的 GA 浓度（单位为μM）。

21. 如果计算所得的 GA 浓度在标曲的线性范围外，则对应的样本需要稀释，直到其测得得 GA 浓度在标曲的线性范围内。必须记录下稀释倍数 N，则计算样本×N 即是稀释前样本的浓度。

六、96 孔板检测

22. 操作同上，只是在设置反应时，反应总体积为 0.25 mL，各成份的用量需要×25%。

附：消光系数法

在大规模筛选或基质比较简单时，还可以选择更加快捷、不需要制备标曲的消光系数法。用户如果选择使用消光系数法，建议先用此法和标曲法同时测定同一个样本，如果结果差异大，则只能使用标曲法。如果差异可以接受，则可使用消光系数法。在操作上，消光系数法不需要制作标曲，在按第二步制备好样本后，直接进行下面的操作。

七、消光系数法的样本测定

23. 按下表设置反应。

成分	N 个待测样本 无酶对照管	N 个待测 样本管

含 NADH 的 GA 测定液 （来于第 2 步）	各 880 μL	各 880 μL
自备 N 个待测样本	各 100 μL	各 100 μL
ADH 储存液 （来于第 1 步）	各 20 μL	不加
ADH 溶液 （来于第 1 步）	不加	各 20 μL

24. 加酶后快速混匀 30 秒后放 30℃反应 30 分钟，再测定每个样本在 340 nm 的 A 值。

八、数据处理

25. 计算真实 A 值：将各样本的 A 值减去所对应的无酶对照样本的 A 值，即得各样本的真实 A 值。

26. 将真实 A 值换算成 GA 浓度：根据朗伯-比尔定律 A = εlC，NADH 在 340 nm 的消光系数ε = 6200/cm*M，比色皿光径 l = 1 cm，则 NADH 的浓度 C = A/εl = A/（6200/cm*M）* 1 cm = A/6200 (单位为 M)。由于 NADH 的浓度改变跟 GA 的浓度改变是 1:1 的关系，故计算所得的 NADH 浓度即是样本中的 GA 浓度。

九、96 孔板检测

27. 操作同上，只是在第 23 步设置反应时，反应总体积为 0.25 mL 而不是 1 mL，故各成份的用量需要×25%；在第 26 步计算时，所用光径也非 1 cm，具体多少需要询问 96 孔板厂家。

关联产品 羟乙醛抽提试剂盒