

乙醇脱氢酶(Alcohol dehydrogenase, ADH)试剂盒说明书

(微板法 96 样)

一、产品简介:

乙醇脱氢酶(ADH, EC 1.1.1.1)存在于许多生物体中, 在人类和许多其他动物中, 能分解有毒的醇类; 在酵母和许多细菌中, 一些醇脱氢酶催化的逆反应作为发酵的一部分。

本试剂盒利用乙醇脱氢酶催化乙醛和 NADH 生成乙醇和 NAD⁺, 通过检测 NADH 在 340nm 的下降速率, 进而计算出乙醇脱氢酶活性的大小。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×2 支	-20℃保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 0.55mL 蒸馏水溶解, 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂二	液体 13mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 1mL×2 支	4℃保存	

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、乙醇脱氢酶(ADH)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:

建议称取约 0.1g 组织, 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】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取

② 细菌/培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10⁴个): 建议 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 20%或 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, 可按照数量 (10⁴个): 提取液体积为 500~1000: 1 的比例进行提取

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 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm。

② 试剂放在 37℃水浴 5min;

③ 在 96 孔板中按照下表依次加入试剂:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	40
试剂一	10
试剂二	130
试剂三	20
混匀, 立即于 340nm 下读取 A1 值, 室温 (25℃) 下, 5min 后读取 A2 值。ΔA=A1-A2。	

【注】: 1. 若 ΔA 过小, 可增加样本体积 V_1 (如增至 $60\mu\text{L}$, 则试剂二相应减少), 或延长反应时间 T (如: 10min 或更长), 重新调整后的样本体积 V_1 和反应时间 T 需代入计算公式重新计算。

2. 若 ΔA 的值大于 0.2 , 需减少样本体积 V_1 (如减至 $20\mu\text{L}$, 则试剂二相应增加), 或缩短反应时间 T (如: 2min 或更短), 重新调整后的样本体积 V_1 和反应时间 T 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟消耗 1nmol NADH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_2] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每分钟消耗 1nmol NADH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 321.54 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 每 1 万个细菌/细胞每分钟消耗 1nmol NADH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.643 \times \Delta A$$

4、按液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体样本每分钟消耗 1nmol NADH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{ADH 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_1 \div T = 321.54 \times \Delta A$$

V_1 ---加入样本体积, 0.04mL ;

V ---加入提取液体积, 1mL ;

V_2 ---反应体系总体积, $2 \times 10^{-4} \text{L}$;

d ---96 孔板光径, 0.5cm ;

500----细菌或细胞总数, 500 万;

W ---样本质量, g ;

ϵ ---NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{L}/\text{mol}/\text{cm}$;

T ---反应时间, 5min ;

Cpr ---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。