

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

(分光法 48 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。

本试剂盒提供一种快速、灵敏的检测方法: 乙醇脱氢酶催化乙醇和 NAD^+ 生成乙醛和 NADH , 产生的 NADH 与特异的显色剂反应, 产生在 450nm 处有最大吸收峰的物质, 通过检测该黄色物质在 450nm 的增加速率, 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 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 70mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	液体 μL ×1 支	4℃ 保存	临用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 2.2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂三	粉体 mg×1 瓶	4℃ 保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加 69mL 试剂一溶解备用。
试剂四	液体 2.5mL×1 支	4℃ 保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	-20℃ 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

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 (10^4 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 (10^4 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 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 450nm, 蒸馏水调零。

② 试剂放在 37℃ 水浴 5min;

③ 在 1mL 玻璃比色皿中按照下表依次加入试剂:

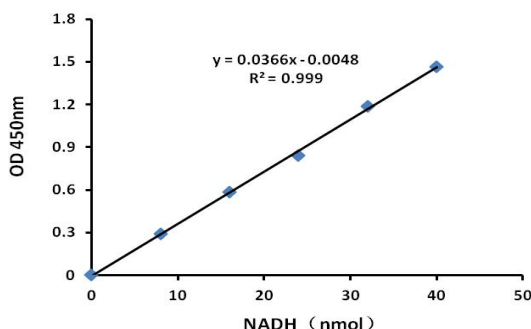
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	80	80
试剂二	40	

试剂三	655	695
试剂四	25	25
混匀，立即 450nm 下读取各管 A1 值，避光反应 15min 后读取各管 A2 值。 $\Delta A = (A2 - A1)$ 测定管 - (A2 - A1) 对照管（每个样本需做一个自身对照）。		

【注】：若 ΔA 过小，可以适当增加样本体积（如增加至 120 μL ，则试剂三相应减少），或延长反应时间（如：60min 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。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.0366x - 0.0048$ ； x 是 NADH 摩尔质量（nmol）， y 是 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算

定义：每毫克组织蛋白每分钟催化 1 nmol NAD⁺ 生成 1nmol NADH 定义为一个酶活单位。

$$\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0048) \div 0.0366] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T = 22.8 \times (\Delta A + 0.0048) \div \text{Cpr}$$

3、按样本鲜重计算

定义：每克组织每分钟催化 1 nmol NAD⁺ 生成 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0048) \div 0.0366] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 22.8 \times (\Delta A + 0.0048) \div W$$

4、按细菌/细胞密度计算：

定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化 1 nmol NAD⁺ 生成 1nmol NADH 定义为一个酶活单位。

$$\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0048) \div 0.0366] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.046 \times (\Delta A + 0.0048)$$

5、按液体体积计算：

定义：每毫升液体样本每分钟催化 1 nmol NAD⁺ 生成 1nmol NADH 为一个酶活力单位。

$$\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0048) \div 0.0366] \div V_1 \div T = 22.8 \times (\Delta A + 0.0048)$$

V----加入提取液体积，1 mL；

V1----加入样本体积，0.08mL；

T----反应时间，15 min；

W----样本质量，g；

500----细菌或细胞总数，500 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 制备标准品母液（1nmol/ μL ）：向标准品 EP 管里面加入 1.41ml 蒸馏水（母液需在两天内用且 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. nmol/ μL 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据 80 μL 标准品+695 μL 试剂一+25 μL 试剂四，混匀 5min 后于 450nm 处读取 A 值，根据结果即可制作标准曲线。