

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处有最大吸收峰的黄色物质,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100mL×1瓶	4℃保存	
试剂一	液体50mL×1瓶	4℃保存	
试剂二	液体1mL×1支	4℃保存	临用前取一支新的EP管,向其中先加1.1mL蒸馏水,再迅速吸取40 μL的试剂二至蒸馏水中,混匀备用。(该试剂极易挥发,所以吸取操作时动作需迅速)
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35mL试剂一溶解备用。
试剂四	液体2mL×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:

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450nm。

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:

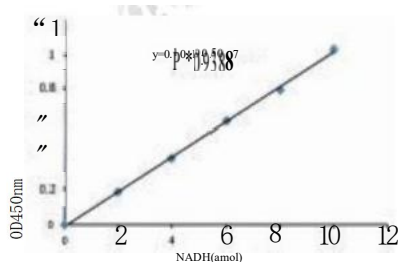
本试剂盒仅供科研使用

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20
试剂二	10	
试剂三	160	170
试剂四	10	10
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 V_1 (如增加至30 μL，则试剂三相应减少)，
或延长反应时间 T (如: 60min 或更长), 重新调整后的 V_1 和 T 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 0.1019x - 0.0087$; 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 nmolNAD⁺生 成 1nmol NADH定义为一个酶活单位。

$$ADH(\text{nmol/min/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0087) \div 0.1019] \div (V_1 \times C_{pr}) \div T = 32.7 \times (\Delta A + 0.0087) \div C_{pr}$$

3、按样本鲜重计算:

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

$$ADH(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0087) \div 0.1019] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 32.7 \times (\Delta A + 0.0087) \div W$$

4、按细菌/细胞密度计算:

5、按液体体积计算:

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

$$ADH(\text{nmol/min}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.0087) \div 0.1019] \div V_1 \div T = 32.7 \times (\Delta A + 0.0087)$$

V ——加入提取液体积, 1mL;

V_1 ——加入样本体积, 0.02mL;

T ——反应时间, 15 min;

W ——样本质量, g;

50——细菌或细胞总数, 万。

C_{pr} ——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℃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20 μL 标准品+170 μL 试剂一+10 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。