

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

(货号: ADS-W-FM012-96 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 40μL 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：

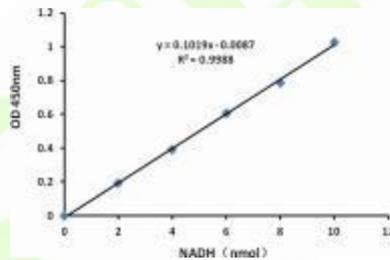
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20
试剂二	10	
试剂三	160	170
试剂四	10	10

混匀，立即 450nm 下读取各管 A1 值，避光反应 15min 后读取各管 A2 值。ΔA= (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 V1 (如增加至 30μL，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 V1 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。

$$ADH(nmol/min/mg \text{ prot}) = [(\Delta A + 0.0087) \div 0.1019] \div (V1 \times Cpr) \div T = 32.7 \times (\Delta A + 0.0087) \div Cpr$$

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。

$$ADH(nmol/min/g \text{ 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0087) \div 0.1019] \div (W \times V1 \div V) \div T = 32.7 \times (\Delta A + 0.0087) \div W$$

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 nmolNAD⁺生成 1nmol NADH 为一个酶活力单位。

$$ADH(nmol/min/104 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0087) \div 0.1019] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.065 \times (\Delta A + 0.0087)$$

5、按液体体积计算：

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

$$ADH(nmol/min/104 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0087) \div 0.1019] \div V1 \div T = 32.7 \times (\Delta A + 0.0087)$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.02mL；

T---反应时间，15 min；

W---样本质量，g；

500---细菌或细胞总数，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/ μ L)：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 $^{\circ}$ 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 / μ L。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据 20 μ L 标准品+170 μ L 试剂一+ 10 μ L 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。