

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

(货号：ADS-F-FM012-48 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 1mL×1 支	4℃保存	临用前取两支新的 EP 管, 向其中一支先加 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 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 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 (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 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°C水浴 5min;

③ 在 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中按照下表依次加入试剂:

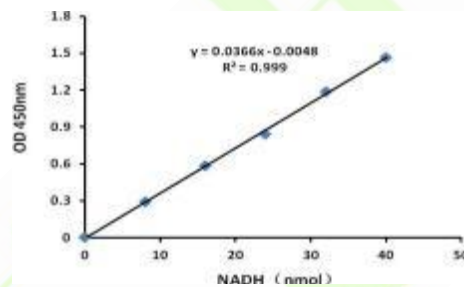
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	80	80
试剂二	40	
试剂三	655	695
试剂四	25	25

混匀, 立即 450nm 下读取各管 A1 值, 避光反应 15min 后读取各管 A2 值。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 120μL, 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: $y = 0.0366x - 0.0048$; 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 nmolNAD⁺生成 1nmol NADH 定义为一个酶活单位。

$$ADH(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0048) \div 0.0366] \div (V1 \times Cpr) \div T = 22.8 \times (\Delta A + 0.0048) \div Cpr$$

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。

$$ADH(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0048) \div 0.0366] \div (W \times V1 \div V) \div T = 22.8 \times (\Delta A + 0.0048) \div W$$

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 nmolNAD⁺生成 1nmol NADH 定义为一个酶活单位。

$$ADH(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0048) \div 0.0366] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.046 \times (\Delta A + 0.0048)$$

5、按液体体积计算:

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

$$ADH(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0048) \div 0.0366] \div V1 \div T = 22.8 \times (\Delta A + 0.0048)$$

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, 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 80 μ L 标准品+695 μ L 试剂一+25 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。