

## Alanopine 脱氢酶(ADH)活性测定试剂盒说明书

(货号: ADS-F-ADH001 紫外法 48 样)

### 一、产品简介:

海洋无脊椎动物主要存在 4 种无氧代谢途径, 其中葡萄糖-opine 途径在无氧代谢初期发挥了重要作用, 无脊椎动物中特有的 Opine 脱氢酶 (OpDHs)保证了这一过程的顺利进行。Alanopine 脱氢酶(ADH; EC 1.5.1.17)是 Opine 脱氢酶 (OpDHs)系列酶中的一种。

Alanopine 脱氢酶(ADH)催化丙酮酸和特异底物丙氨酸反应生成相应的亚氨基酸, 同时使 NADH 发生氧化, 通过检测 NADH 在特征吸收波长 340nm 处的下降速率即可得出 ADH 酶活性大小。

### 二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 2 支	-20°C保存	使用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 每支分别加 0.55mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融, 一周内用完。
试剂二	液体 1 支	4°C保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂三	液体 32mL×1 瓶	4°C保存	

### 三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

### 四、Alanopine 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:

称取约 0.1g 组织样本, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm 4°C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/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液; 冰浴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°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

**【注】:** 若增加样本量, 可按照细菌或细胞数量 ( $10^4$  个): 提取液体积(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

#### 2、上机检测:

① 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

② 在 1mL 石英比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	60
试剂一	20
试剂二	20
试剂三	600
混匀, 室温 (25°C) 下, 于 340nm 读取吸光值 A1, 5min 后读取吸光值 A2,	

$$\Delta A = A1 - A2。$$

- 【注】**
- 1.若 10s 后反应体系未稳定可延长到 1min 后再读取 A1 值。
  - 2.若  $\Delta A$  的值小于 0.005, 可以适当延长反应时 T (如由 5min 增至 10min) 读取 A2, 或适当加大样本量 V1 (如增至 100 $\mu$ L, 则试剂三相应减少), 则改变后的 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。
  - 3.若起始值 A1 太大如超过 2 (如颜色较深的样本), 可以适当减少样本加样量 V1 (如减至 30 $\mu$ L, 则试剂三相应增加), 则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。
  - 4.若  $\Delta A$  的值大于 0.35, 则需减少反应时间 T (如减至 2min), 则改变后的反应时间 T 需代入计算公式重新计算。
  - 5.若下降趋势不稳定, 可以每隔 20S 读取一次吸光值, 选取一段线性下降的时间段来参与计算, 相对应的 A 值也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:

定义: 每毫克组织蛋白在每分钟内氧化 1 nmol NADH 所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$ADH(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 375.13 \times \Delta A \div Cpr$$

### 2、按样本鲜重计算:

定义: 每克组织在每分钟内氧化 1nmol NADH 所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$ADH(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 375.13 \times \Delta A \div W$$

### 3、按细菌或细胞密度计算:

定义: 每一万个细菌或细胞每分钟内氧化 1nmol NADH 所需酶量定为一个酶活力单位。

$$ADH(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.75 \times \Delta A \div W$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.06mL;

V2---反应体系总体积, 7 $\times 10^{-4}$  L;

d---光径, 1cm;

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

W---样本质量, g;

T---反应时间, 5min;

500---细菌或细胞总数, 万;

Cpr---蛋白浓度 (mg/mL), 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。