

## 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 有效期：3 个月)

### 一、指标介绍：

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<sup>+</sup> 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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 70mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 1mL×1 支	4°C避光保存	1. 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； 2. 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°C保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加 69mL 试剂一溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 2.5mL×1 瓶	4°C避光保存	
标准品	粉剂 1 支	-20°C保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

### 三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

### 四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

#### 1、样本提取：

##### 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°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/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<sup>4</sup> 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°C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、检测步骤：

- 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：

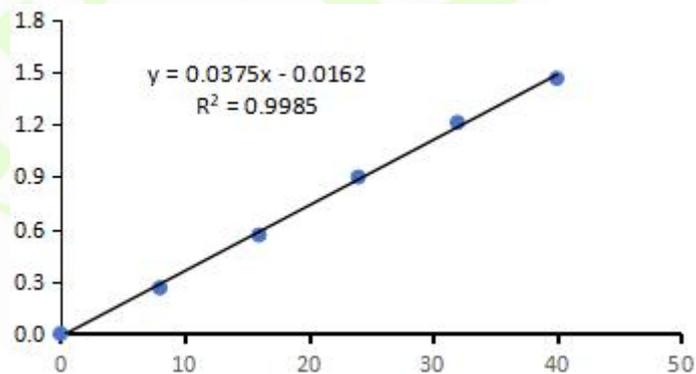
试剂组分 ( $\mu\text{L}$ )	测定管	对照管
样本	80	80
试剂二	40	
试剂三	655	695
试剂四	25	25

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  $\Delta A$  过小，可以适当增加样本体积  $V_1$  (如增加至 120 $\mu\text{L}$ ，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： $y = 0.0375x - 0.0162$ ； $x$  是 NADH 摩尔质量 (nmol)， $y$  是  $\Delta A$ 。



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<sup>+</sup>生成 1nmol NADH 定义为一个酶活单位。

$$\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0162) \div 0.0375] \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T = 22.2 \times (\Delta A + 0.0162) \div C_{\text{pr}}$$

3、按样本鲜重计算：

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

$$\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0162) \div 0.0375] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 22.2 \times (\Delta A + 0.0162) \div W$$

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<sup>+</sup>生成 1nmol NADH 定义为一个酶活单位。

$$\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[(\Delta A+0.0162)\div 0.0375]\div(500\times V1\div V)\div T=0.044\times(\Delta A+0.0162)$$

5、按液体体积计算：

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

$$\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[(\Delta A+0.0162)\div 0.0375]\div V1\div T=22.2\times(\Delta A+0.0162)$$

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 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），标准品母液浓度为 1nmol/μL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. nmol/μL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 500uL，加入 500uL 蒸馏水，混匀得到 0.5nmol/μL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 nmol/μL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	80	
蒸馏水		80
试剂一	695	695
试剂四	25	25
混匀 5min 后于 450nm 处读取 A 值，△A=A 测定-0 浓度管。		