

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

(货号: ADS-F-FM012 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。

本试剂盒利用乙醇脱氢酶催化乙醛和 NADH 生成乙醇和 NAD⁺,通过检测 NADH 在 340nm 的下降速率,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℃保存 | |
| 试剂一 | 粉剂 3 支 | -20℃保存 | 每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 0.55mL 蒸馏水溶解,用不完的试剂分装后-20℃保存,禁止反复冻融,三天内用完。 |
| 试剂二 | 液体 26mL×1 瓶 | 4℃保存 | |
| 试剂三 | 液体 1.5mL×2 支 | 4℃避光保存 | |

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 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、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℃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、检测步骤:

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 试剂放在 37℃水浴 5min;

③ 在 1mL 石英比色皿(光径 1cm)中按照下表依次加入试剂:

| 试剂组分 (μL) | 测定管 |
|-----------|-----|
| 样本 | 120 |
| 试剂一 | 30 |
| 试剂二 | 510 |
| 试剂三 | 60 |

混匀，立即于 340nm 下读取 A1 值，室温 (25°C) 下，5min 后读取 A2 值。 $\Delta A=A1-A2$ 。

- 【注】：1. 若 ΔA 过小，可增加样本体积 V1（如增至 160 μ L，则试剂二相应减少），或延长反应时间 T（如：10min 或更长），重新调整后的样本体积 V1 和反应时间 T 需代入计算公式重新计算。
2. 若 ΔA 的值大于 0.3，需减少样本体积 V1（如减至 80 μ L，则试剂二相应增加），或缩短反应时间 T（如：2min 或更短），重新调整后的样本体积 V1 和反应时间 T 需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：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟消耗 1nmol NADH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T=192.93 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟消耗 1 nmol NADH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T=192.93 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌/细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌/细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T=0.39 \times \Delta A$$

4、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体样本每分钟消耗 1nmol NADH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{ADH 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T=192.93 \times \Delta A$$

V1---加入样本体积，0.12mL；

V---加入提取液体积，1mL；

V2---反应体系总体积，7.2 $\times 10^{-4}$ L；

d---光径，1cm；

500---细菌或细胞总数，500 万；

W---样本质量，g；

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

T---反应时间，5min；

Cpr---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。