

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 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^+ 生成乙醛和 NADH , 产生的 NADH 与特异的显色剂反应, 产生在 450nm 处有最大吸收峰的黄色物质, 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 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℃避光保存	1. 临用前取一支新的 EP 管, 向其中先加 1.1mL 蒸馏水; 2. 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); 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	粉体 mg×1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 35mL 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 2mL×1 支	4℃避光保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	-20℃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)、96 孔板、离心管、酶标仪、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 (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 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:

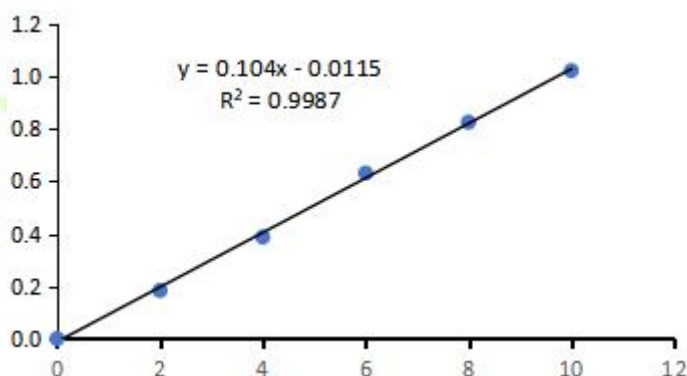
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20
试剂二	10	
试剂三	160	170
试剂四	10	10
混匀, 立即 450nm 下读取各管 A1 值, 避光反应 15min 后读取各管 A2 值。ΔA= (A2-A1) 测定管- (A2-A1)对照管 (每个样本需做一个自身对照)。		

【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: $y = 0.104x - 0.0115$; 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。

$$\text{ADH}(\text{nmol/min/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0115) \div 0.104] \div (V1 \times Cpr) \div T = 32.1 \times (\Delta A + 0.0115) \div Cpr$$

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。

$$\text{ADH}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0115) \div 0.104] \div (W \times V1 \div V) \div T = 32.1 \times (\Delta A + 0.0115) \div W$$

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。

$$\text{ADH}(\text{nmol/min/104 cell}) = [(\Delta A + 0.0115) \div 0.104] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.064 \times (\Delta A + 0.0115)$$

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。
 $ADH(nmol/min/mL)=[(\Delta A+0.0115)\div 0.104]\div V1\div T=32.1\times(\Delta A+0.0115)$

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 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	20	
蒸馏水		20
试剂一	170	170
试剂四	10	10
混匀 5min 后于 450nm 处读取 A 值， $\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。		