

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

(货号: ADS-W-FM012 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 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 2 支	-20℃ 保存	每支: 1. 临用前 8000g 4 ° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 0.55mL 蒸馏水溶解; 3. 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 13mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	液体 1mL×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)、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 (10^4 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 340nm。

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
样本	40
试剂一	10

试剂二	130
试剂三	20
混匀，立即于 340nm 下读取 A1 值， 室温（25℃）下，5min 后读取 A2 值。ΔA=A1-A2。	

- 【注】：1. 若ΔA 过小，可增加样本体积 V1（如增至 60μL，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 0.2，需减少样本体积 V1（如减至 20μL，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。

$$\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T = 321.54 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.643 \times \Delta A$$

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。

$$\text{ADH 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 321.54 \times \Delta A$$

V1---加入样本体积，0.04mL；

V2---反应体系总体积，2×10⁻⁴ L；

500----细菌或细胞总数，500 万；

ε---NADH 摩尔消光系数，6.22×10³ L/mol/cm；

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。

V---加入提取液体积，1mL；

d---96 孔板光径，0.5cm；

W---样本质量，g；

T---反应时间，5min；