

Alanopine 脱氢酶(ADH)活性测定试剂盒说明书

(货号: BP10242F 紫外法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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 2 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 蒸馏水溶解备用; 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融, 一周内用完。
试剂二	液体 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 32mL ×1 瓶	4℃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:

称取约 0.1g 组织样本, 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/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℃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、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 在 1mL 石英比色皿(光径 1cm)中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管
样本	60

试剂一	20
试剂二	20
试剂三	600
混匀，室温（25℃）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 ΔA 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 μ 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 μ 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 ΔA 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。

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

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。

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

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。

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

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；

ϵ ---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。