

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

(货号: BP10237F-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⁺ 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 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 70mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 1mL×1 支	4℃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℃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℃避光保存	
标准品	粉剂 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)、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℃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 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；

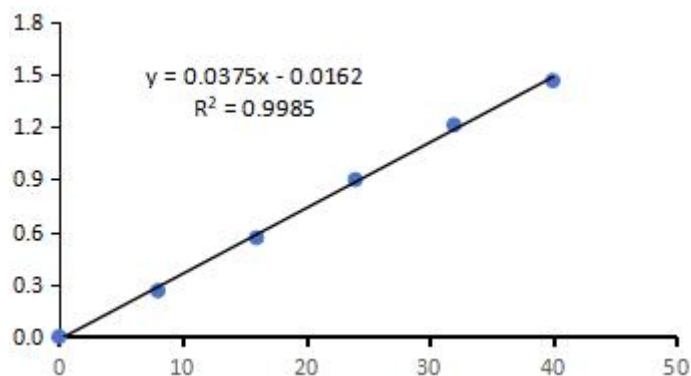
③ 在 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中按照下表依次加入试剂：

试剂组分 (μL)	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 ΔA 过小，可以适当增加样本体积 V_1 (如增加至 120μL，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 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。

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

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。

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

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⁺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⁺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。		