上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co.， Ltd
电话：021-61312973　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：shyysw@sina.com

乙醇脱氢酶

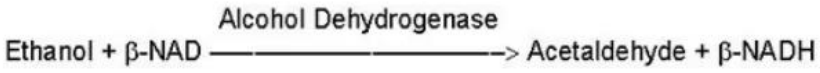
货号：S35255

保存温度：-20℃保存。

描述：

该方法适用于醇脱氢酶产物，但不溶形式的醇脱氢酶除外。

连续分光光度法测定（A340，光路= 1 cm）是基于以下反应：



β-NAD = β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸，氧化

β-NADH = β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸，还原

单位定义：一个单位的醇脱氢酶在 pH 8.8、25℃下，每分钟将 1.0 µmole 乙醇转化为乙醛。

所需试剂和设备：

磷酸，焦磷酸四钠 十水化合物，乙醇 95％（v/v），β-NAD 水合物，磷酸一氢钠，5 M 磷酸一氢钠，磷酸二氢钠，0.5 M 磷酸二氢钠，牛血清白蛋白。

注意事项：

请参阅产品化学品安全技术说明书，获取危害和安全操作方法相关信息。

制备说明：

使用超纯水（25 °C 时 ≥ 18 MΩ×cm 电阻率）制备试剂。

9.5％（v/v）磷酸 — 在纯水中制备 0.095 mL/mL 磷酸溶液。

50 mM 磷酸钠缓冲液，pH 8.8（25℃） — 在超纯水中制备 22.3 mg/mL 焦磷酸四钠 十水化合物溶液。在 25℃下用 9.5％（v/v）磷酸将 pH 调节至 8.8。

乙醇 95％（v/v）

15 mM β-NAD（β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸）溶液 — 在超纯水中制备 11.6 mg/mL 的β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸水合物溶液。

10 mM 磷酸钠缓冲液，pH 7.5（25℃）— 制备 500 mL 缓冲液：加入 21.0 mL 0.2 M 磷酸二氢钠溶液，该溶液由 0.5 M 磷酸二氢钠溶液制备而来。然后加入 4.0 mL 0.2 M 磷酸一氢钠溶液，该溶液由 5 M 磷酸一氢钠溶液制备而来。最后用超纯水定容 500 mL。在 25 °C 下用 1 M NaOH 或 1 M HCl 将 pH 值调节至 pH 7.5。

酶稀释液（10 mM 磷酸钠缓冲液，pH 7.5，含 0.1％（w/v）牛血清白蛋白）— 在 10 mM 磷酸钠缓冲液（pH 7.5）中制备 1 mg/mL 牛血清白蛋白溶液。用 1 M NaOH 或 1M HCl 将 pH 调节至 7.5（25°C）。

ADH 原液 — 在 pH 7.5 的冷（2-8°C）10 mM 磷酸钠缓冲液中制备 1 mg/mL 醇脱氢酶溶液。

注意：新鲜制备

ADH 工作溶液 — 在使用前，立即用冷酶稀释液将 0.050 mL ADH 原液稀释至 25.0 mL。

注意：新鲜制备

注意：如果该酶浓度产生ΔA340/分钟 > 0.15，则用冷酶稀释液将 0.050 mL ADH 原液稀释至 50.0 mL。如果测定粗产物，则仅相应修改酶稀释方案。

操作流程：

在 3.00 mL 反应混合物中，最终浓度为 22 mM 焦磷酸钠，3.2％（v/v）乙醇，7.5 mM β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸，0.3 mM 磷酸钠，0.003％（w/v）牛血清白蛋白，和 0.001-0.002 mg/ml 醇脱氢酶。

1.在合适的比色皿中，准确移取以下物质：

试剂	试样 1(ml)	试样 2(ml)	试样 3(ml)	空白样 (ml)
50 mM 磷酸钠缓冲液，pH 8.8	1.30	1.30	1.30	1.30

95% (v/v)乙醇	0.10	0.10	0.10	0.10
15 mM ß-NAD 溶液	1.50	1.50	1.50	1.50

2.倒置混合。将比色皿放入适当恒温的分光光度计中平衡至 25℃。

3.然后添加：

试剂	测试 1 (mL)	测试 2 (mL)	测试 3 (mL)	空白 (mL)
ADH 工作溶液	0.10	0.10	0.10	–
酶稀释液	–			0.10

4.立即通过倒置混合，并记录 6 分钟内的 A340 增量。

5.对于测试和空白，使用 1-6 分钟的范围获得 A340/分钟。

结果：

计算：

1.单位/ml 酶 =（ΔA340/分钟 检测 – ΔA340/分钟 空白）*(3.0)* (df)/(6.22) *(0.1)

3.0 = 测定的总体积（mL）

df = 稀释因子

6.22 = 在 340 nm 处的毫摩尔β-NADH 消光系数

0.1 = 使用的酶溶液的体积（mL）

2.单位/mg 固体 =（单位/ml 酶）/（mg 固体/ml 酶）