



乙醇脱氢酶(ADH)试剂盒(可见显色法)

可见分光光度法

货号: R45057-48S

产品简介:

乙醇脱氢酶(ADH,EC1.1.1.1)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。

试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
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℃保存	临用前取一支新的EP管,向其中先加1.1mL蒸馏水,再迅速吸取40μL的试剂二至蒸馏水中,混匀备用。(该试剂极易挥发,所以吸取操作时动作需迅速)
试剂三	粉体mg×1瓶	4℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部,再加69mL试剂一溶解备用。
试剂四	液体2.5mL×1支	4℃保存	
标准品	粉剂mg×1支	-20℃保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径1cm)、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

乙醇脱氢酶(ADH) 活性测定:



建议正式实验前选取2个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

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、上机检测:

①见分光光度计预热30min 以上，调节波长至450nm, 蒸馏水调零。

②试剂放在37℃水浴5min;

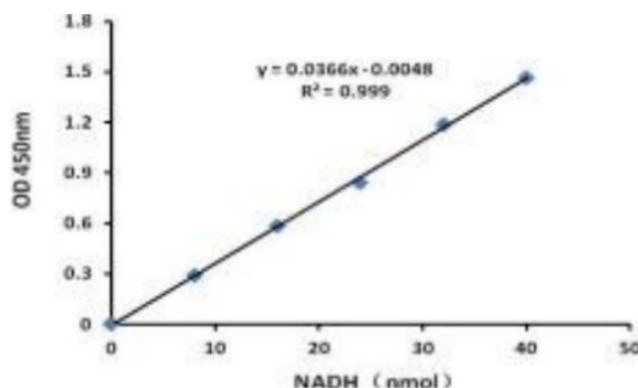
③ 在 1mL 玻璃比色皿(光径1cm) 中按照下表依次加入试剂:

试剂名称(μL)	测定管	对照管
样本	80	80
试剂二	40	
试剂三	655	295
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)。		



结果计算：

1、标准曲线： $y=0.0366x-0.0048$ ；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。

$$\begin{aligned}\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0048) \div 0.0366] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 22.8 \times (\Delta A + 0.0048) \div Cpr\end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned}\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0048) \div 0.0366] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 22.8 \times (\Delta A + 0.0048) \div W\end{aligned}$$

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1nmolNAD 生成 1nmolNADH 定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) &= [(\Delta A + 0.0048) \div 0.0366] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 0.046 \times (\Delta A + 0.0048)\end{aligned}$$

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。

$$\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.0048) \div 0.0366] \div V1 \div T$$



$$=22.8 \times (\Delta A + 0.0048)$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1--- 加入样本体积, 0.08mL;

T---反应时间, 15min;

W--- 样本质量, g;

50---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.制备标准品母液(1nmol/μL): 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)。

2.把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5.nmol/μL 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

3.依据80μL 标准品+695 μL 试剂一+25 μL 试剂四, 混匀5min 后于450nm 处读取 A 值, 根据结果即可制作标准曲线。

源叶