



Alanopine脱氢酶 (ADH)活性测定试剂盒

紫外分光光度法

货号: R45064-48S

产品简介:

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;EC1.5.1.17) 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。

试剂盒的组成和配制:

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	粉剂mg×2支	-20℃保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部,每支分别加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μL×1支	4℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加1.1mL蒸馏水溶解备用。
试剂三	液体32mL×1瓶	4℃保存	

所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿(光径1cm)、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

Alanopine 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,了解本批样品和实验流程,避免样本和试剂浪费!

1、样本制备:



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/细胞数量(10^4 个):提取液体积(mL)为500~1000:1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紫外分光光度计预热30min以上, 调节波长至340nm, 蒸馏水调零。

②所有试剂解冻至室温(25℃),在1mL石英比色皿(光径1cm)中依次加入:

试剂名称(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, $\Delta A=A1-A2$ 。	

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1nmol NADH所需酶量定义为一个酶活力单位。ADH(nmol/min/mg

$$\text{prot})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V1 \times Cpr) \div T=375.13 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

$$\text{ADH}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ = 375.13 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{ADH}(\text{nmol/min}/10^4\text{cell}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T \\ = 0.75 \times \Delta A \div W$$

4、按液体体积计算:

定义: 每毫升液体在每分钟内氧化 1nmol NADH 所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{ADH}(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_1 \div T \\ = 375.13 \times \Delta A$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.06mL;

V2---反应体系总体积, 7×10^{-4} L;

d---- 光径, 1cm;

ϵ ---NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 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。