

## 乙醇脱氢酶(Alcohol dehydrogenase, ADH)试剂盒说明书

(货号: G0874W 微板法 96 样)

### 一、产品简介:

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。

本试剂盒利用乙醇脱氢酶催化乙醛和 NADH 生成乙醇和 NAD<sup>+</sup>,通过检测 NADH 在 340nm 的下降速率,进而计算出乙醇脱氢酶活性的大小。

### 二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×2 支	-20℃保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 0.55mL 蒸馏水溶解,用不完的试剂分装后-20℃保存,禁止反复冻融,三天内用完。
试剂二	液体 13mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 1mL×2 支	4℃保存	

### 三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

### 四、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<sup>4</sup>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<sup>4</sup>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 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 340nm。

② 试剂放在 37℃水浴 5min;

③ 在 96 孔板中按照下表依次加入试剂:

试剂名称(μL)	测定管
样本	40
试剂一	10
试剂二	130
试剂三	20
混匀,立即于 340nm 下读取 A1 值, 室温(25℃)下,5min 后读取 A2	

值。  $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

【注】：1. 若  $\Delta A$  过小，可增加样本体积  $V_1$ （如增至  $60\mu\text{L}$ ，则试剂二相应减少），或延长反应时间  $T$ （如： $10\text{min}$  或更长），重新调整后的样本体积  $V_1$  和反应时间  $T$  代入计算公式重新计算。

2. 若  $\Delta A$  的值大于  $0.2$ ，需减少样本体积  $V_1$ （如减至  $20\mu\text{L}$ ，则试剂二相应增加），或缩短反应时间  $T$ （如： $2\text{min}$  或更短），重新调整后的样本体积  $V_1$  和反应时间  $T$  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：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟消耗  $1\text{nmol}$  NADH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_2] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

### 2、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟消耗  $1\text{nmol}$  NADH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 321.54 \times \Delta A \div W$$

### 3、按细菌/细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌/细胞每分钟消耗  $1\text{nmol}$  NADH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.643 \times \Delta A$$

### 4、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体样本每分钟消耗  $1\text{nmol}$  NADH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{ADH 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_1 \div T = 321.54 \times \Delta A$$

$V_1$ ---加入样本体积， $0.04\text{mL}$ ；

$V$ ---加入提取液体积， $1\text{mL}$ ；

$V_2$ ---反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}\text{L}$ ；

$d$ ---96 孔板光径， $0.5\text{cm}$ ；

500----细菌或细胞总数，500 万；

$W$ ---样本质量， $\text{g}$ ；

$\epsilon$ ---NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3\text{L}/\text{mol}/\text{cm}$ ；

$T$ ---反应时间， $5\text{min}$ ；

$\text{Cpr}$ ---蛋白质浓度， $\text{mg}/\text{mL}$ ，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。