# Alcohol dehydrogenase Activity Assay Kit

# 乙醇脱氢酶(ADH)试剂盒说明书

货号：G0806W | 方法：微板法 | 规格：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：

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|---|---|---|---|
| 提取液 | 液体 100mL×1 瓶 | 4℃保存 | |
| 试剂一 | 液体 50mL×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 35mL 试剂一溶解备用。 |
| 试剂四 | 液体 2mL×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。 |

## 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（$10^4$ 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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。

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：

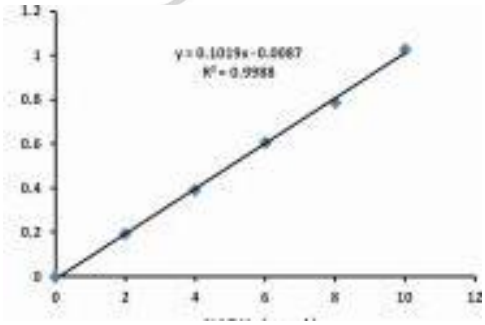

For research use only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.
本产品仅供科研使用，不得用于临床诊断或治疗。

| 试剂名称（μL） | 测定管 | 对照管 |
|---|---|---|
| 样本 | 20 | 20 |
| 试剂二 | 10 | |
| 试剂三 | 160 | 170 |
| 试剂四 | 10 | 10 |
| 混匀，立即 450nm 下读取各管 A1 值，避光反应 15min 后读取各管 A2 值。ΔA=（A2-A1）测定管-（A2-A1）对照管（每个样本需做一个自身对照）。 | | |

**注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。**

## 五、结果计算：

1、标准曲线：y = 0. 1019x - 0.0087；x 是 NADH 摩尔质量（nmol），y 是 ΔA。



标准曲线示意图

**说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。**

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(nmol/min /mg prot)=[(ΔA+0.0087)÷0. 1019]÷(V1×Cpr) ÷T=32.7×(ΔA+0.0087)÷Cpr

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(nmol/min/g 鲜重)=[(ΔA+0.0087)÷0. 1019]÷(W×V1÷V)÷T=32.7×(ΔA+0.0087)÷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 为一个酶活力单位。

ADH(nmol/min/ $10^4$ cell)=[(ΔA+0.0087)÷0. 1019]÷(500×V1÷V)÷T=0.065×(ΔA+0.0087)

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。

ADH(nmol/min/ $10^4$ cell)=[(ΔA+0.0087)÷0. 1019]÷V1÷T=32.7×(ΔA+0.0087)

V---加入提取液体积，1 mL；　　V1---加入样本体积，0.02mL；

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；


For research use only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.
本产品仅供科研使用，不得用于临床诊断或治疗。