

Alanopine 脱氢酶(ADH)活性测定试剂盒说明书

(货号: G0887W 微板法 96 样)

一、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; EC 1.5.1.17)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。

二、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 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 mg×2 支	-20°C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°C保存, 禁止反复冻融, 一周内用完。
试剂二	液体 μL×1 支	4°C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 16mL×1 瓶	4°C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、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:

称取约 0.1g 组织样本, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm 4°C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°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm。

② 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	160

混匀，室温（25°C）下，于 340nm 读取
吸光值 A1，5min 后读取吸光值 A2，
 $\Delta A = A1 - A2$ 。

- 【注】** 1.若 10s 后反应体系未稳定可延长到 1min 后再读取 A1 值。
- 2.若 ΔA 的值小于 0.005，可以适当延长反应时 T（如由 5min 增至 10min）读取 A2，或适当加大样本量 V1（如增至 40 μ L，则试剂三相应减少），则改变后的 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。
3. 若起始值 A1 太大如超过 2（如颜色较深的样本），可以适当减少样本加样量 V1（如减至 10 μ L，则试剂三相应增加），则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。
4. 若 ΔA 的值大于 0.35 或 A2 值低于 0.35，则需减少反应时间 T（如减至 5min）读取 A2，则改变后的反应时间 T 需代入计算公式重新计算。
5. 若下降趋势不稳定，可以每隔 20S 读取一次吸光值，选取一段线性下降的时间段来参与计算，相对应的 A 值也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：

定义：每毫克组织蛋白在每分钟内氧化 1 nmol NADH 所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$ADH(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 643.1 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

$$ADH(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div W$$

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。

$$ADH(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 1.29 \times \Delta A \div W$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.02mL；

V2---反应体系总体积，2 $\times 10^{-4}$ L；

d---96 孔板光径，0.5cm；

ϵ ---NADH 摩尔消光系数，6.22 $\times 10^3$ 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。