

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

(货号: G0874F 分光法 48 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 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	粉剂 mg×3 支	-20°C 保存	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°C 保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂二	液体 26mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂三	液体 1.5mL×2 支	4°C 保存	

## 三、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。

## 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°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/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°C 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 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

② 试剂放在 37°C 水浴 5min;

③ 在 1mL 石英比色皿 (光径 1cm) 中按照下表依次加入试剂:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	120
试剂一	30
试剂二	510
试剂三	60
混匀, 立即于 340nm 下读取 A1 值, 室温 (25°C) 下, 5min 后读取 A2 值。ΔA=A1-A2。	

【注】: 1. 若 $\Delta A$  过小, 可增加样本体积  $V_1$  (如增至 160 $\mu$ L, 则试剂二相应减少), 或延长反应时间  $T$  (如: 10min 或更长), 重新调整后的样本体积  $V_1$  和反应时间  $T$  需代入计算公式重新计算。

2. 若 $\Delta A$  的值大于 0.3, 需减少样本体积  $V_1$  (如减至 80 $\mu$ L, 则试剂二相应增加), 或缩短反应时间  $T$  (如: 2min 或更短), 重新调整后的样本体积  $V_1$  和反应时间  $T$  需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 1nmol NADH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_2] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T = 192.93 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

### 2、按样本鲜重计算:

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

$$\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 192.93 \times \Delta A \div W$$

### 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 nmol NADH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.39 \times \Delta A$$

### 4、按液体体积计算:

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

$$\text{ADH 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_1 \div T = 192.93 \times \Delta A$$

$V_1$ ---加入样本体积, 0.12mL;

$V$ ---加入提取液体积, 1mL;

$V_2$ ---反应体系总体积,  $7.2 \times 10^{-4}$  L;

$d$ ---光径, 1cm;

500----细菌或细胞总数, 500 万;

$W$ ---样本质量, g;

$\epsilon$ ---NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  L/mol/cm;  $T$ ---反应时间, 5min;

$\text{Cpr}$ ---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。