

Alanopine 脱氢酶(ADH)活性测定试剂盒

紫 外 法 48 样

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。

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

② 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 ， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

[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 100μL，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 30μL，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，则需减少反应时间 T (如减至 2min)，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。

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。

$$ADH(nmol/min/mg \text{ prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 375.13 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

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

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。

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

V---加入提取液体积, 1 mL; 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。