

Alanopine 脱氢酶(ADH)活性测定试剂盒

微板法 96 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 酶活性大小。

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	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 16mL×1 瓶	4℃保存	

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。

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 酶标仪预热 30 min 以上，调节波长为 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℃）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。

1、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

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。

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

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。

$$\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div W。$$

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。

$$\text{ADH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 1.29 \times \Delta A \div W。$$

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, 2×10^{-4} L; d---96 孔板光径, 0.5cm;

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。