

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0407

Size: 100T/96S

乙醇脱氢酶 (ADH) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

ADH是生物体内短链醇代谢的关键酶,催化乙醇与乙醛可逆转换,在很多生理过程中起着重要作用。哺乳动物ADH主要在肝脏生成,肝脏损伤导致ADH释放到血清中。血清ADH活性高低反映了肝功能是否异常。

二、测定原理:

ADH催化NADH还原乙醛生成乙醇和 NAD^+ ,NADH在340nm处有吸收峰,而 NAD^+ 没有;测定340nm吸光度下降速率,来计算ADH活性。

三、需自备的仪器和用品:

研钵、冰、低温离心机、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板(ZC-1036:UV板)、可调式移液器和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体×1瓶	室温保存	
试剂二	液体×1瓶	4℃保存	临用前把试剂三转移到试剂二中,4℃保存
试剂三	粉剂×1瓶	-20℃保存	
试剂四	液体×1支	4℃保存	

五、粗酶液提取：

- 1、组织：按照组织质量 (g) : 试剂一体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂一) 进行冰浴匀浆。16000g, 4°C 离心 20min, 取上清置冰上待测。
- 2、细菌、真菌：按照细胞数量 (10⁴个) : 试剂一体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 16000g, 4°C 离心 20min, 取上清液置冰上待测。
- 3、血清等液体：直接测定。

六、ADH 测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长到 340nm, 蒸馏水调零。
2. 试剂二在 25°C 水浴中保温 30min。
3. 空白管：在微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板) 中依次加入 20 μL 蒸馏水、160 μL 试剂二和 20 μL 试剂四, 迅速混匀后于 340nm 测定吸光值变化, 分别记录 15s 和 75s 时吸光值, 分别记为 A1 和 A2。ΔA 空白管 = A1 - A2。
4. 测定管：在微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板) 中依次加入 20 μL 上清液、160 μL 试剂二和 20 μL 试剂四, 迅速混匀后于 340nm 测定吸光值变化, 分别记录 15s 和 75s 时吸光值, 分别记为 A3 和 A4。ΔA 测定管 = A3 - A4。

注意：空白管只需测定一次。

七、计算公式：

- 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按照蛋白浓度计算

活性单位定义：25°C 中每毫克蛋白每分钟氧化 1 μmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{ADH } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta\text{A测定管} - \Delta\text{A空白管}) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 1.61 \times (\Delta\text{A测定管} - \Delta\text{A空白管}) \div \text{Cpr}$$

(2) 按照样本质量计算

活性单位定义：25°C中每克组织每分钟氧化1 μmol NADH 为1个酶活单位。

$$\text{ADH } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}) = [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.61 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：25°C中每10⁴个细胞每分钟氧化1 μmol NADH为1个酶活单位。

$$\text{ADH } (\mu\text{mol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.61 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：25°C中每毫升血清每分钟氧化1 μmol NADH为1个酶活单位。

$$\text{ADH } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div V_{\text{样}} \div T = 1.61 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}})$$

ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10³ L/mol/cm；d：比色皿光径，1 cm；V 反总：反应体系总体积，200 μL=2×10⁻⁴ L；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量；V 样：加入反应体系中上清液体积，20 μL=0.02 mL；V 样总：提取液体积，1 mL；T：反应时间，1min。

● 使用96孔板（UV板）测定的计算公式如下

(1) 按照蛋白浓度计算

活性单位定义：25°C中每毫克蛋白每分钟氧化1 μmol NADH为1个酶活单位。

$$\text{ADH } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1.61 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按照样本质量计算

活性单位定义：25°C中每克组织每分钟氧化1 μmol NADH为1个酶活单位。

$$\text{ADH } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}) = [(\Delta\text{A测定管} - \Delta\text{A空白管}) \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反应总}} \times 10^6] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.61 \times (\Delta\text{A测定管} - \Delta\text{A空白管}) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：25°C中每10⁴个细胞每分钟氧化1 μmol NADH 为1个酶活单位。

$$\text{ADH } (\mu\text{mol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = [(\Delta\text{A测定管} - \Delta\text{A空白管}) \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反应总}} \times 10^6] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.61 \times (\Delta\text{A测定管} - \Delta\text{A空白管}) \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：25°C中每毫升血清每分钟氧化1 μmol NADH为1个酶活单位。

$$\text{ADH } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta\text{A测定管} - \Delta\text{A空白管}) \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反应总}} \times 10^6] \div V_{\text{样}} \div T = 1.61 \times (\Delta\text{A测定管} - \Delta\text{A空白管})$$

ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10³L/mol/cm；d：96孔板光径，0.5 cm；V 反应总：反应体系总体积，200 μL=2×10⁻⁴ L；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量；V 样：加入反应体系中上清液体积，20 μL=0.02 mL；V 样总：提取液体积，1 mL；T：反应时间，1min。

八、注意事项：

1. 上清液蛋白质浓度需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒(货号：ZC-S0470)
2. 配制好的试剂二3天使用完。