

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-S0585

Size: 50T/48S

乙醇脱氢酶 (ADH) 检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

*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、1mL 石英比色皿、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℃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℃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. 分光光度计预热 30min，调节波长到 340nm，蒸馏水调零。
2. 试剂二在 25℃水浴中保温 30min。
3. 空白管：在 1mL 石英比色皿中依次加入 100 μL 蒸馏水、800 μL 试剂二和 100 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。
 $\Delta A \text{ 空白管} = A1 - A2$ 。
4. 测定管：在 1mL 石英比色皿中依次加入 100 μL 上清液、800 μL 试剂二和 100 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。
 $\Delta A \text{ 测定管} = A3 - A4$ 。

注意：空白管只需测定一次。

七、计算公式：

(1) 按照蛋白浓度计算

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

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

(2) 按照样本质量计算

活性单位定义：25℃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℃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℃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，1cm；V 反总：反应体系总体积，1000 μL=0.001 L；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；V 样：加入反应体系中上清液体积，100 μL=0.1 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。