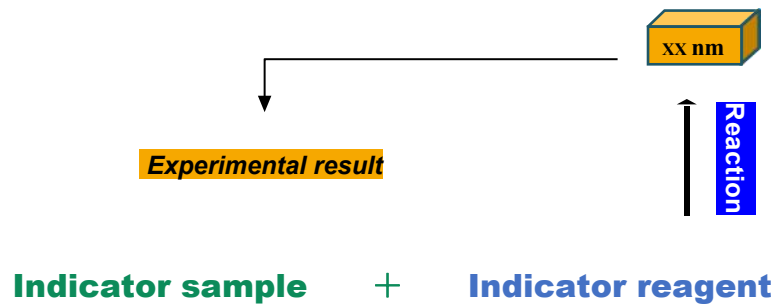


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

乙醇脱氢酶（ADH）检测试剂盒说明书

微量法

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

产品内容：

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	-

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。

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。

自备仪器和用品：

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（UV板）、可调式移液器和蒸馏水。

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。

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℃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。

计算公式:

a. 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。

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

(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。

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

(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。

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

(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。

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

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。

b. 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。

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

(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。

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

(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。

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

(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。

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

ε: NADH 摩尔消光系数, 6.22×10³L/mol/cm; d: 96 孔板光径, 0.5 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。

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。
2. 配制好的试剂二3天使用完。