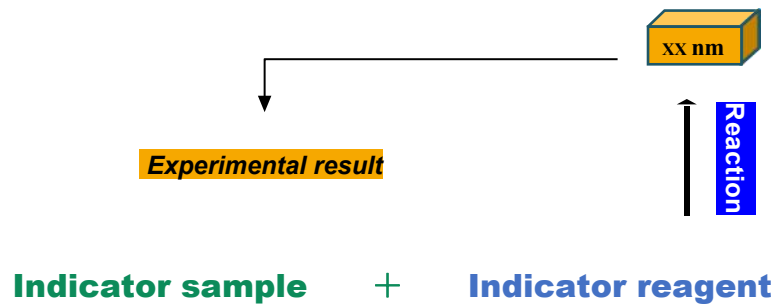


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

货号：ZC-S0585

规格：50管/48样

乙醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase, ADH) 活性测定试剂盒说明书

紫外分光光度法

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。

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、1mL 石英比色皿、可调式移液器和蒸馏水。

试剂组成和配制：

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	-

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。△A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。△A 测定管=A3-A4。

注意：空白管只需测定一次。

计算公式:

(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。

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

(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。

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

(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, 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。

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。