



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

乙醇脱氢酶(ADH)活性检测试剂盒(微量法)

货号: R41978

规格: 100T/96S

有效期: 6个月

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
试剂-A	液体100m×1瓶	4℃保存;
试剂-B	液体20ml×1瓶	4℃保存; 内含不溶物, 混匀后使用即可; 临用前把试剂- C转移到试剂-B中, 可分装后-20℃保存, 避免反复冻融; 临用前把试剂-B置于25℃水浴中保温30 min。
试剂-C	粉剂×1支	-20℃保存;
试剂-D	液体5ml×1瓶	4℃保存;

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

简介

意义: 乙醇脱氢酶 (ADH) 是一类催化醇类转化为醛的酶, 伴随着 NAD⁺还原为 NADH。在人类中, 有 9 种 ADH 同工酶, 其中大部分 ADH 活性发生在肝脏。ADH 家族成员是参与酒精解毒的主要酶; ADH酶的遗传变异导致 ADH 活性和酒精耐受性的差异, 并可能调节酒精中毒的易感性。

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。

自备用品:

紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、低温离心机、水浴锅、研钵、可调式移液枪和蒸馏水。

粗酶液提取:



1. 组织: 按照组织质量 (g): 试剂-A 体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入1mL 试剂-A) 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 (10^4 个): 试剂-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500万细胞加入 1mL 试剂-A), 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。

测定步骤:

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热 30 min, 调节波长到 340 nm, 蒸馏水调零。

2. 试剂-B 置于 25℃水浴中保温 30 min。

3. 取微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板), 依次按下表加入:

试剂名称	空白管(ul)	测定管(ul)
蒸馏水	20	
试剂-B	160	
试剂-D	20	
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。		
样品上清液		20
试剂-B		160
试剂-D		20
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 1-2 次。

乙醇脱氢酶(ADH)活性计算:

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℃中每毫克蛋白每分钟氧化 $1\mu\text{mol}$ NADH 为 1 个酶活单位。



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

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。

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

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。

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

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。

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

注: ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22 $\times 10^3$ L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1 cm; V 反总: 反应体系总体积, 200 μL =2 $\times 10^{-4}$ L; 106: 单位换算系数, 1mol=1 $\times 10^6$ μmol ; 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; 细胞数量: 以万计。

b. 使用 96 孔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。

$$\text{ADH (U/mg prot)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T = 3.215 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{ADH (U/g)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 3.215 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$



3. 按细胞数量计算

活性单位定义: 25°C中每 10^4 个细胞每分钟氧化 $1\mu\text{mol}$ NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{ADH (U/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 3.215 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

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 $1\mu\text{mol}$ NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{ADH (U/mL)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div V \text{ 样} \div T$$
$$= 3.215 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管})$$

注: ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 96 孔板光径, 0.5 cm ;
 $V \text{ 反总}$: 反应体系 总体积, $200\mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$; 10^6 : 单位换算系 $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$;
 C_{pr} : 上清液蛋白质浓度, mg/mL ; W : 样品质量; $V \text{ 样}$: 加入反应体系中上清液
体积, $20\mu\text{L} = 0.02 \text{ mL}$; $V \text{ 样总}$: 提取液体积, 1 mL ; T : 反应时间, 1 min ; 细胞数
量: 以万计。

注意事项:

为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴乳胶手套操作。

源叶