



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(分光光度法)

货号: R41977

规格: 50T/48S

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50ml×1瓶	2-8℃保存;
试剂-B	液体50ml×1瓶	2-8℃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	2-8℃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、1ml 石英比色皿、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. 在 1mL 石英比色皿中依次按下表加入:

试剂名称	空白管(ul)	测定管(ul)
蒸馏水	100	
试剂-B	800	
试剂-D	100	
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。		
样品上清液		100
试剂-B		800
试剂-D		100
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		

注意: 空白管只需测定 1次。

乙醇脱氢酶(ADH)活性计算:

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。

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

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 μ mol 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 μ mol NADH 为 1 个酶活单位。

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

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 μ mol NADH 为 1 个酶活单位。

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

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, 1000 μ L=0.001 L; 10⁶: 单位换算系数, 1mol=1 $\times 10^6$ μ mol; 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 μ L=0.1 mL; T: 反应时间, 1min。

注意事项:

1. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴乳胶手套操作。
2. 试剂-A 临用前置于 37°C水浴中预热 30min。