

乙醇脱氢酶（ADH）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：AC10238

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4°C保存
粉剂一	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 45mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×2 支	-20°C保存
试剂三	液体 6 mL×1 瓶	4°C保存

溶液的配制：

- 1、提取液：临用前将粉剂一倒入提取液中，溶液为悬浊液，使用前需摇匀；
- 2、试剂二：临用取一支加入 1.5mL 蒸馏水，-20°C分装保存 4 周，避免反复冻融。

产品说明：

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。

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。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

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、研钵/匀浆器、蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）进行冰浴匀浆。16000g，4°C离心 20min，取上清置冰上待测。

2、细菌、真菌：按照细胞数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），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°C离心 20min，取上清液置冰上待测。

3、血清等液体：直接测定。

二、测定步骤

- 1、分光光度计预热30min，调节波长到340nm，蒸馏水调零。
- 2、试剂一在25°C水浴中保温15min以上。

- 3、空白管：在1mL石英比色皿中依次加入**100μL蒸馏水**、40μL试剂二、760μL试剂一和100μL试剂三，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。 $\Delta A_{\text{空白管}}=A1-A2$ 。（空白管只需做1~2个）
- 4、测定管：在1mL石英比色皿中依次加入**100μL上清液**、40μL试剂二、760μL试剂一和100μL试剂三，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。 $\Delta A_{\text{测定管}}=A3-A4$ 。

三、ADH活性计算

(1) 按蛋白浓度计算

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

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

$$= 1.61 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：25°C中每克组织每分钟氧化1μmol NADH为1个酶活单位。

$$\text{ADH (U/g 质量)} = [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 1.61 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W$$

(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1μmol NADH为1个酶活单位。

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

$$= 1.61 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：25°C中每毫升样本每分钟氧化1μmol NADH为1个酶活单位。

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

ε : NADH摩尔消光系数, 6.22×10³L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V反总: 反应体系总体积, 1000μL=0.001L; V样总, 加入提取液的体积, 1mL; 10⁶: 单位换算系数, 1mol=1×10⁶μmol; 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, 100μL=0.1mL; T: 反应时间, 1min; 细胞数量: 以万计。

注意事项:

上清液蛋白质浓度需要另外测定。

实验实例:

- 取 0.1g 大鼠肝脏按照提取和测定步骤操作，测得计算 $\Delta A_{\text{空白管}}=A1-A2=0.558-0.557=0.001$ ， $\Delta A_{\text{测定管}}=A3-A4=0.812-0.587=0.225$ ，按样本质量计算酶活得：
 $\text{ADH (U/g 质量)} = 1.61 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W = 1.61 \times (0.225 - 0.001) \div 0.1 = 3.6064 \text{ U/g 质量}$ 。
- 取小鼠血浆直接检测，测得计算 $\Delta A_{\text{空白管}}=A1-A2=0.558-0.557=0.001$ ， $\Delta A_{\text{测定管}}=A3-A4=0.708-0.676=0.032$ ，按液体体积计算酶活得：
 $\text{ADH (U/mL)} = 1.61 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) = 1.61 \times (0.032 - 0.001) = 0.04991 \text{ U/mL}$ 。

相关系列产品:

- BC0590/BC0595 游离脂肪酸（FFA）含量检测试剂盒
- BC2340/BC2345 脂肪酶（LPS）活性检测试剂盒
- BC0750/BC0755 乙醛脱氢酶（ALDH）活性检测试剂盒