

## 乙醇脱氢酶（ADH）活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1440

产品规格：100管/96样

### 产品简介：

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<sup>+</sup>，NADH在340nm处有吸收峰，而NAD<sup>+</sup>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。**

### 试验中所需的仪器和试剂：

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、研钵/匀浆器、蒸馏水。

### 产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体100mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体20mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1瓶	-20℃
试剂三	液体2mL×1瓶	2-8℃

### 溶液的配制：

1. 提取液：内含不溶物，使用前摇匀；
2. 试剂一：临用前把试剂二转移到试剂一中，分装保存于-20℃。

### 自备材料：

紫外分光光度计、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1mL石英比色皿、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

### 操作步骤（仅供参考）：

#### 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℃离心 20min，取上清置冰上待测。
2. 细菌、细胞：按照细胞数量（10<sup>4</sup>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℃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. 紫外分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长到 340nm，蒸馏水调零。
2. 试剂一在 25℃ 水浴中保温 30min 以上。
3. 空白管：在微量石英比色皿//96 孔板（UV 板）中依次加入 20μL 蒸馏水、160μL 试剂一和 20μL 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。ΔA 空白管=A1-A2。（空白管只需做 1~2 个）
4. 测定管：在微量石英比色皿//96 孔板（UV 板）中依次加入 20μL 上清液、160μL 试剂一和 20μL 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。ΔA 测定管=A3-A4。

#### 三、ADH 活性计算

- a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

(1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义：25℃中每毫克蛋白每分钟氧化 1 $\mu$ 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) 按样本质量计算

活性单位定义：25℃中每克组织每分钟氧化 1 $\mu$ mol NADH 为 1 个酶活单位。

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

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：25℃中每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟氧化 1 $\mu$ 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℃中每毫升样本每分钟氧化 1 $\mu$ mol NADH 为 1 个酶活单位。

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

$\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数, 6.22 $\times 10^3$ L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应体系总体积, 200 $\mu$ L=2 $\times 10^{-4}$ L; 10<sup>6</sup>: 单位换算系数, 1mol=1 $\times 10^6$  $\mu$ 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, 20 $\mu$ L=0.02mL; V 样总: 提取液体积, 1mL; 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 $\mu$ mol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{ADH (U/mg prot)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T = 2.68 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：25℃中每克组织每分钟氧化 1 $\mu$ mol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{ADH (U/g 质量)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 2.68 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：25℃中每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟氧化 1 $\mu$ mol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{ADH (U / 10}^4\text{cell)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 2.68 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：25℃中每毫升样本每分钟氧化 1 $\mu$ mol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{ADH (U/mL)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div V \text{ 样} \div T = 2.68 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管})$$

$\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数, 6.22 $\times 10^3$ L/mol/cm; d: 96 孔板光径, 0.6cm; V 反总: 反应体系总体积, 200 $\mu$ L=2 $\times 10^{-4}$ L; 10<sup>6</sup>: 单位换算系数, 1mol=1 $\times 10^6$  $\mu$ 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, 20 $\mu$ L=0.02mL; V 样总: 提取液体积, 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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com