

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⁺，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。

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（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℃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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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

(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 1μmol NADH 为 1 个酶活单位。

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

(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 1μmol NADH 为 1 个酶活单位。

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

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：25℃中每 10⁴ 个细胞每分钟氧化 1μmol NADH 为 1 个酶活单位。

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

(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 1μmol NADH 为 1 个酶活单位。

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

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, 200μL=2×10⁻⁴L; 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, 20μL=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 1μmol NADH 为 1 个酶活单位。

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

(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 1μmol NADH 为 1 个酶活单位。

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

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：25℃中每 10⁴ 个细胞每分钟氧化 1μmol NADH 为 1 个酶活单位。

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

(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 1μmol NADH 为 1 个酶活单位。

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

ε: NADH 摩尔消光系数, 6.22×10³L/mol/cm; d: 96 孔板光径, 0.6cm; V 反总: 反应体系总体积, 200μL=2×10⁻⁴L; 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, 20μL=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

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com