

## 乙醇脱氢酶(ADH)检测试剂盒(乙醛微板法)

产品货号: BA1747

产品规格: 100T

### 产品简介:

乙醇脱氢酶(ADH)的系统名为乙醇:辅酶I氧化还原酶(alcohol: NAD<sup>+</sup> oxidoreductase)，大量存在于人和动物肝脏、植物及微生物细胞之中，是一种含锌金属酶，具有广泛的底物特异性。乙醇脱氢酶够以烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)为辅酶，催化伯醇和醛之间的可逆反应:  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{CHO} + \text{NADH} + \text{H}^+$ 。在人和哺乳动物体内，乙醇脱氢酶与乙醛脱氢酶(ALDH)构成了乙醇脱氢酶系，参乙醇脱氢酶与体内乙醇代谢，是人和动物体内重要的代谢酶，作为生物体内主要短链醇代谢的关键酶，它在很多生理过程中起着重要作用。丙酮酸脱羧酶(PDC)、乙醇脱氢酶(ADH)是乙醇发酵途径的关键酶，无氧呼吸途径代谢产物的过程积累对细胞产生毒性，影响线粒体结构和三羧酸循环的相关酶活性。

尚宝生物 乙醇脱氢酶(ADH)检测试剂盒(乙醛微板法) 检测原理是在弱碱条件下，以乙醛为底物，乙醛在ADH催化下被NADH还原为乙醇，ADH每催化1分子乙醛消耗1分子NADH，通过分光光度比色法(酶标仪)定测定340nm处吸光度的变化，计算出NADH的消耗速率进一步推算出乙醇脱氢酶活性水平，该试剂盒主要用于检测植物样本、血清等中乙醇脱氢酶活性。该试剂盒仅用于科研领域，不宜用于临床诊断或其他用途。

### 产品组成:

产品名称	100T	保存条件
试剂(A): ADH Lysis buffer	250ml	2-8℃, 避光
试剂(B): PMSF	1ml	-20℃
试剂(C): ADH Assay buffer	20ml	室温
试剂(D): NADH	1支	-20℃
试剂(E): ddH <sub>2</sub> O	1ml	室温
试剂(F): ADH启动剂	1ml	2-8℃, 避光

### 自备材料:

1. 研钵或匀浆器
2. 离心管或试管
3. 低温离心机
4. 96孔板、酶标仪

### 操作步骤(仅供参考):

1. 配制ADH Lysis buffer工作液: 取出ADH Lysis buffer和PMSF, 恢复至室温, 按ADH Lysis buffer: PMSF=499:1的比例混合, 即为ADH Lysis buffer工作液。即配即用, 不宜久置, 否则蛋白酶抑制剂PMSF的效率会有所下降。
2. 准备样品:
  - ①取植物样品: 取0.5g植物组织(根系)清洗干净, 切碎, 按植物组织: ADH Lysis buffer 工作液=0.5g : 2ml的比例, 加入预冷的ADH Lysis buffer工作液, 冰浴情况下充分匀浆或研磨, 4℃12000g离心20min, 留取上清液即为乙醇脱氢酶粗提液。短期4℃保存待用, 长期-20℃冻存待用。
  - ②血浆、血清和尿液样品: 血浆、血清按照常规方法制备后可以直接用于本试剂盒的测定, -20℃冻存, 用于乙醇脱氢酶的检测。
  - ③用细胞或组织样品: 取恰当细胞或组织裂解液, 如有必要用ADH Lysis buffer工作液进行适当匀浆, 4℃ 12000g离心20min, 取上清液, -20℃冻存, 用于乙醇脱氢酶的检测。
  - ④用高活性样品: 如果样品中含有较高活性的乙醇脱氢酶, 可以使用ADH Lysis buffer工作液进行恰当的稀释。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物技术有限公司

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>

3. 配制NADH工作液：取出1支NADH，恢复至室温，准确溶解于1ml ddH<sub>2</sub>O，混匀，4℃预冷备用，-20℃保存1周有效。注意：该NADH工作液为过量。
4. 配制ADH Assay buffer工作液：取出ADH Assay buffer、NADH工作液，恢复至室温，按ADH Assay buffer:NADH工作液=8000: 1的比例混合，即为ADH Assay buffer工作液。该液最好即配即用，4℃预冷备用，-20℃保存1周有效。
5. ADH加样：按照下表设置对照孔(备选，一般可以不设对照孔)、测定孔，溶液应按照顺序依次加入，并注意避免产生气泡。如果样品中的乙醇脱氢酶活性过高，可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定，样品的检测最好能设置平行孔。

加入物(μl)	对照孔(备选)	测定孔
ADH Lysis buffer工作液	5	-
待测样品	-	5
ADH Assay buffer工作液	200	200

6. ADH测定：加入ADH启动剂2μl，立即以酶标仪测定340nm处吸光度(记为A<sub>0</sub>) 并同隔时计时，每隔30s测定1次340nm处吸光度，其中至1min时340nm处吸光度记为A<sub>1</sub>，记录其变化。尚宝 建议加入ADH启动剂后立即检测，加样时间越短越好，其在反应基本在1~2min内，其后反应趋于平缓。

**注意：**该反应系统是利用速率变化，求得相应OD的变化，进而推算出NADH的消耗速率，再进一步推算出乙醇脱氢酶的量，因此加入ADH启动剂立即计时很重要，每次检测指标不宜过多，否则有可能由于操作时间有差异进而导致结果偏差。

#### 计算：

乙醇脱氢酶活性定义：每分钟NADH氧化吸光度变化0.01为1个酶活力单位。

液体样品 ADH(U/ml ·min)=  $\Delta A / (0.01 \times t \times 0.005)$

式中：  $\Delta A = A_0 - A_1$  ( 如有必要，可再减去对照最初1min的吸光度变化量)

0.01=每分钟NADH氧化吸光度变化0.01为1个酶活力单位

t=检测时间(min)=1

0.005=待测样品体积(ml)

组织样品 ADH(U/g ·min)=  $\Delta A / (0.01 \times t \times W)$

式中：  $\Delta A = A_0 - A_1$  ( 如有必要，可再减去对照最初1min的吸光度变化量)

0.01= 每分钟NADH氧化吸光度变化0.01为1个酶活力单位

t=检测时间(min)=1

W=待测样品鲜重或干重(g)

组织或植物粗酶液获得率(ml)=上清液体积(ml)/组织或植物质量×100%

#### 注意事项：

1. 实验材料应尽量新鲜，如取材后不立即使用，应存于-20~80℃。
2. 待测样品中不能含有磷酸酶抑制剂，同时需避免反复冻融。
3. 如果没有酶标仪，也可以使用普通的分光光度计测定，但应考虑分光光度计的最小检测体积。
4. 该反应系统是利用速率变化，求得相应OD的变化，进而推算出NADH的消耗速率，再进一步推算出乙醇脱氢酶的量，因此加入ADH启动剂立即计时很重要，每次检测指标不宜过多，否则有可能由于操作时间有差异进而导致结果偏差。
5. 在酶液的稀释度应尽量控制在A340/min下降范围在0.1-0.2之间，以便减少实验误差。
6.  $\Delta A$ 为反应最初1min内340nm处吸光度变化的绝对量，如有必要可减去对照液最初1min的吸光度变化量。
7. 用所测待测样品的浓度过高，应用ADH Lysis buffer工作液稀释样品后重新测定。

**有效期：** 6个月有效。



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物技术有限公司**

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>