



乙醇脱氢酶（ADH）活性检测试剂盒说明书

微量法

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：BC1085

规格：100T/96S

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
粉剂一	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 20mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂三	液体 3 mL×1 瓶	2-8℃保存

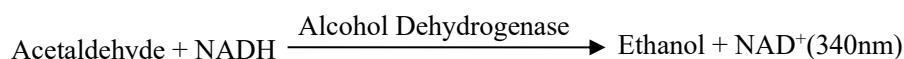
溶液的配制：

- 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：临用前取 1 支试剂二加入 1mL 蒸馏水，可以-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融。1 支即可做 100T，为延长试剂盒使用时间，遂多给一支。

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/酶标仪、水浴锅、微量石英比色皿/96孔板（UV板）、可调式移液器、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、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℃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，紫外分光光度计用蒸馏水调零。
- 2、试剂一在25°C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**、8μL试剂二、152μL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。 $\Delta A_{\text{空白管}}=A1-A2$ 。（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**、8μL试剂二、152μL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。 $\Delta A_{\text{测定管}}=A3-A4$ 。

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

(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。

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

(2) 按样本质量计算

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

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

(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°C中每毫升样本每分钟氧化1μmol NADH为1个酶活单位。

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

ϵ : NADH摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1cm ; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $200\mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{L}$; 10^6 : 单位换算系数, $1\text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$; Cpr : 上清液蛋白质浓度, mg/mL ; W : 样本质量, g ; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积, $20\mu\text{L} = 0.02\text{mL}$; $V_{\text{样总}}$: 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°C中每毫克蛋白每分钟氧化1μmol NADH为1个酶活单位。

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

(2) 按样本质量计算

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

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

(3) 按细胞数量计算

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

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

(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。

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

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, 需要自行测定; 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:

1、若A3大于1.5或者A3小于A1, 则需要将样本用蒸馏水稀释再进行测定, 计算公式注意乘以稀释倍数。

实验实例:

- 1、取 0.1g 大鼠肝脏加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清后按照测定步骤操作, 用微量石英比色皿测得计算 ΔA 空白管=A1-A2=0.5718-0.5648=0.007, ΔA 测定管=A3-A4=0.8351-0.5341=0.301, 按样本质量计算酶活得: ADH (U/g 质量)=1.61×(ΔA 测定管-ΔA 空白管)÷W=1.61×(0.301-0.007)÷0.1=4.7334 U/g 质量。
- 2、取马血清直接检测, 用微量石英比色皿测得计算 ΔA 空白管=A1-A2=0.5718-0.5648=0.007, ΔA 测定管=A3-A4=0.6369-0.6036=0.0333, 按液体体积计算酶活得: ADH ((U/mL)=1.61×(ΔA 测定管-ΔA 空白管)=1.61×(0.0333-0.007)=0.042343 U/mL。
- 3、取小鼠血浆直接检测, 用微量石英比色皿测得计算 ΔA 空白管=A1-A2=0.5718-0.5648=0.007, ΔA 测定管=A3-A4=0.7381-0.7093=0.0288, 按液体体积计算酶活得: ADH (U/mL)=1.61×(ΔA 测定管-ΔA 空白管)=1.61×(0.0288-0.007)=0.035098 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
- BC0320/BC0325 植物中脂氧合酶 (LOX) 活性检测试剂盒
- BC0750/BC0755 乙醛脱氢酶 (ALDH) 活性检测试剂盒