

乙醇脱氢酶（ADH）活性测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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。

测定原理：

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。

组成：

产品名称	CE018-100T/96S	Storage
试剂一：液体	1 瓶	室温
试剂二：液体	1 瓶	4°C
试剂三：粉剂	2 瓶	-20°C
试剂四：液体	1 支	4°C
说明书	一份	

试剂三：粉剂×2 瓶，-20°C 保存，临用前每瓶加入 9ml 试剂二，现配现用。

自备仪器和用品：

研钵、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、可调式移液器和蒸馏水。

粗酶液提取：

- 1、组织：按照组织质量（g）：试剂一体积（ml）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1ml 试剂一）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（ 10^4 个）：试剂一体积（ml）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1ml 试剂一），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。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



ADH 测定操作:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min, 调节波长到 340 nm, 蒸馏水调零。
2. 试剂三在 25°C 水浴中保温 30 min。
3. 在微量石英比色皿/96 孔板中依次加入 20 μ l 样本上清液、160 μ l 试剂三和 20 μ l 试剂四, 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。△A 测定管=A1-A2。

计算公式:

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按照蛋白浓度计算

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

$$\begin{aligned} \text{ADH (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 1608 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算

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

$$\begin{aligned} \text{ADH (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1608 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(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 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{ADH (nmol/min/10}^4\text{cell)} &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1608 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义: 25°C 中每毫升血清每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{ADH (nmol/min/ml)} &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 1608 \times \Delta A \end{aligned}$$

ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22 $\times 10^3$ L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1 cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 200 μ l=2 $\times 10^{-4}$ L; Cpr: 上清液蛋白质浓度, mg/ml; W: 样品质量; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积, 20 μ l=0.02 ml; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1 ml; T: 反应时间, 1min。

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

(1) 按照蛋白浓度计算

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

$$\begin{aligned} \text{ADH (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 3215 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算

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

$$\begin{aligned} \text{ADH (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 3215 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(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 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{ADH (nmol/min/10}^4\text{cell)} &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 3215 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$



(4) 按液体体积计算

活性单位定义：25°C中每毫升血清每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{ADH (nmol/min/ml)} = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9) \div V_{\text{样}} \div T \\ = 3215 \times \Delta A$$

ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 96 孔板光径, 0.5 cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $200 \mu\text{l} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$; C_{pr} : 上清液蛋白质浓度, mg/ml; W : 样品质量; $V_{\text{样}}$: 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, 1 ml; T : 反应时间, 1min。

