

使用说明书

Instruction Manual

乙醇脱氢酶(ADH)活性检测试剂盒 (微量法) Alcohol Dehydrogenase Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

乙醇脱氢酶 (ADH) 是一类催化醇类转化为醛的酶, 伴随着 NAD⁺还原为 NADH。在人类中, 有 9 种 ADH 同工酶, 其中大部分 ADH 活性发生在肝脏。ADH 家族成员是参与酒精解毒的主要酶; ADH 酶的遗传变异导致 ADH 活性和酒精耐受性的差异, 并可能调节酒精中毒的易感性。

检测原理

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。

产品组成及储存条件

100T/96S 规格的产品组成如下:

组成	规格	储存条件
CB0017M-A	液体 100mL×1 瓶	4°C保存。
CB0017M-B	液体 20mL×1 瓶	4°C保存; 内含不溶物, 混匀后使用即可; 临用前把 CB0017M-C 转移到 CB0017M-B 中, 可分装后-20°C保存, 避免反复冻融; 临用前把 CB0017M-B 置于 25°C水浴中保温 30 min。
CB0017M-C	粉剂×1 支	-20°C保存。
CB0017M-D	液体 5mL×1 瓶	4°C保存。

注: 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、自备用品:

紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、低温离心机、水浴锅、研钵、可调式移液枪和蒸馏水。

二、粗酶液提取:

- 组织: 按照组织质量 (g): CB0017M-A 体积(mL)为 1: 5-10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL CB0017M-A) 进行冰浴匀浆。16000g, 4°C离心 20min, 取上清置冰上待测。
- 细菌、真菌: 按照细胞数量 (10⁴ 个): CB0017M-A 体积 (mL) 为 500-1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL CB0017M-A), 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。
- 血清等液体: 直接测定。

三、测定步骤:

- 紫外分光光度计/酶标仪预热 30 min, 调节波长到 340 nm, 蒸馏水调零。
- CB0017M-B 置于 25°C水浴中保温 30 min。
- 取微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板), 依次按下表加入:

试剂名称	空白管 (μL)	测定管 (μL)
蒸馏水	20	
CB0017M-B	160	
CB0017M-D	20	
迅速混匀后于 340nm 测定吸光值变化, 记录 15s 和 75s 时吸光值, 分别记为 A1 和 A2, ΔA 空白管=A1-A2。		
样品上清液		20
CB0017M-B		160
CB0017M-D		20
迅速混匀后于 340nm 测定吸光值变化, 记录 15s 和 75s 时吸光值, 分别记为 A3 和 A4, ΔA 测定管=A3-A4。		

注: 空白管只需测定 1-2 次。

四、乙醇脱氢酶(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 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 1μmol NADH 为 1 个酶活单位。

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

$$= 1.61 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

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中每毫升血清每分钟氧化 1μmol NADH 为 1 个酶活单位。

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

$$= 1.61 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管})$$

注: ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10³L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1 cm; V 反总: 反应体系总体积, 200μL=2×10⁻⁴ L; 10⁶: 单位换算系数, 1mol=1×10⁶μmol; Cpr: 上清液蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 20μL=0.02 mL; V 样总: 提取液体积, 1 mL; 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 1μmol NADH 为 1 个酶活单位。

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

$$= 3.215 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

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 1μmol NADH 为 1 个酶活单位。

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

$$= 3.215 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

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。

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

$$= 3.215 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

4. 按液体体积计算

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

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

$$= 3.215 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管})$$

注： 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 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， $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ； C_{pr} ：上清液蛋白质浓度， mg/mL ； W ：样品质量； V 样：加入反应体系中上清液体积， $20 \mu\text{L} = 0.02 \text{ mL}$ ； V 样总：提取液体积，1 mL； T ：反应时间，1min；细胞数量：以万计。

注意事项

1. 蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
2. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

