使用说明书

Instruction Manual

乙醇脱氢酶(ADH)活性检测试剂盒（紫外分光光度法）

Alcohol Dehydrogenase Assay Kit (UV Spectrophotometry)

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

50T/48S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0017UV-A	液体 50mL×1 瓶	4°C保存。
CB0017UV-B	液体 50mL×1 瓶	4°C保存；内含不溶物，混匀后使用即可；临用前把 CB0017UV-C 转移到 CB0017UV-B 中；可分装后-20°C保存，避免反复冻融；临用前把 CB0017UV-B 置于 25°C水浴中保温 30 min。
CB0017UV-C	粉剂×1 支	-20°C保存。
CB0017UV-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、1mL 石英比色皿、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：

1. 组织：按照组织质量（g）：CB0017UV-A 体积(mL)为 1：5-10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL CB0017UV-A）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（104 个）：CB0017UV-A 体积（mL）为 500-1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL CB0017UV-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。
3. 血清等液体：直接测定。

三、测定步骤：

1. 紫外分光光度计预热 30 min，调节波长到 340 nm，蒸馏水调零。
2. CB0017UV-B 置于 25°C水浴中保温 30 min。
3. 在 1mL 石英比色皿中依次按下表加入：

试剂名称	空白管 (μL)	测定管 (μL)
蒸馏水	100	
CB0017UV-B	800	
CB0017UV-D	100	
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 空白管=A1-A2。		
样品上清液		100
CB0017UV-B		800
CB0017UV-D		100
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。 △ A 测定管=A3-A4。		

注：空白管只需测定一次。

四、乙醇脱氢酶(ADH)活性计算：

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。
   ADH (U/mg prot) = [(△A 测定管-△A 空白管)÷ε÷d×V 反总×10^6]÷(Cpr×V 样)÷T
   = 1.61×(△A 测定管-△A 空白管) ÷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。
   ADH (U/g) = [(△A 测定管-△A 空白管)÷ε÷d×V 反总×10^6]÷(W×V 样÷V 样总)÷T
   = 1.61×(△A 测定管-△A 空白管) ÷W
3. 按细胞数量计算
   活性单位定义：25°C中每 10^4 个细胞每分钟氧化 1μmol NADH 为 1 个酶活单位。
   ADH (U/10^4cell) = [(△A 测定管-△A 空白管)÷ε÷d×V 反总×10^6]÷(细胞数量×V 样÷V 样总)÷T
   = 1.61×(△A 测定管-△A 空白管) ÷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。
   ADH (U/mL) = [(△A 测定管-△A 空白管)÷ε÷d×V 反总×10^6]÷V 样÷T
   = 1.61×(△A 测定管-△A 空白管)
   注：ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L/mol/cm；d：比色皿光径，1 cm；V 反总：反应体系总体积，1000μL=0.001 L；10^6：单位换算系数，1mol=1×10^6 μmol；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，100μL=0.1 mL；T：反应时间，1min。

注意事项

1. CB0017UV-A 临用前置于 37°C水浴中预热 30min。
2. 蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
3. 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。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

TargetMol®所有产品和服务仅用于科学研究，不能被用于人体，我们不向个人提供产品和服务。
官方微信公众号 积分商城小程序