

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

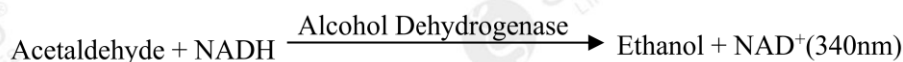
溶液的配制：

- 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。

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℃水浴中保温30min以上。
- 3、空白管：在微量石英比色皿/96孔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℃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℃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℃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℃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 : 微量石英比色皿光径, 1 cm ; $V_{\text{反总}}$: 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, 1 mL ; T : 反应时间, 1 min ; 细胞数量: 以万计。

b.使用96孔UV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℃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℃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℃中每10⁴个细胞每分钟氧化1μmol NADH为1个酶活单位。

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

$$= 2.68 \times (\Delta A \text{测定管} - \Delta A \text{空白管}) \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

活性单位定义：25℃中每毫升样本每分钟氧化1μmol NADH为1个酶活单位。

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

ε: NADH摩尔消光系数, 6.22×10³L/mol/cm; d: 96孔UV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:

- 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。
- 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。
- 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。

相关发表文献:

- [1] Tong L, Huang S, Shen Y, Liu S, Ma X, Zhu F, Chen G, Ouyang G. Atomically unveiling the structure-activity relationship of biomacromolecule-metal-organic frameworks symbiotic crystal. *Nat Commun.* 2022 Feb 17;13(1):951. doi: 10.1038/s41467-022-28615-y. PMID: 35177632; PMCID: PMC8854593.
- [2] Gao Z, Wang D, Zhang H, Yang J, Li M, Lu H, Shen H, Tang Y. An iron-deficient diet prevents alcohol- or diethylnitrosamine-induced acute hepatotoxicity in mice by inhibiting ferroptosis. *Curr Res Food Sci.* 2022 Nov 5; 5:2171-2177. doi: 10.1016/j.crfs.2022.11.001. PMID: 36387594; PMCID: PMC9664348.
- [3] Wang W, Liu T, Liu Y, Yu L, Yan X, Weng W, Lu X, Zhang C. Astaxanthin attenuates alcoholic cardiomyopathy via inhibition of endoplasmic reticulum stress-mediated cardiac apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2021 Feb 1; 412:115378. doi: 10.1016/j.taap.2020.115378. Epub 2021 Jan 2. PMID: 33352188.
- [4] Zhou ZW, Wu QY, Ni ZX, Hu QC, Yang Y, Zheng YC, Bi WJ, Deng HL, Liu ZZ, Ye NX, Lai ZX, Sun Y. Metabolic Flow of C6 Volatile Compounds From LOX-IIPL Pathway Based on Airflow During the Post-harvest Process





of Oolong Tea. Front Plant Sci. 2021 Oct 22; 12:738445. doi: 10.3389/fpls.2021.738445. PMID: 34745173; PMCID: PMC8569582.

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

