

乙醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase, ADH) 活性测定试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

自备仪器和用品：

研钵、冰、低温离心机、紫外分光光度计、1mL 石英比色皿、可调式移液器和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体×1 瓶，室温保存。

试剂二：液体×1 瓶，4℃保存。临用前把试剂三转移到试剂二中，4℃保存。

试剂三：粉剂×1 瓶，-20℃保存。

试剂四：液体×1 支，4℃保存。

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℃离心 20min，取上清置冰上待测。
- 2、细菌、真菌：按照细胞数量 (10⁴ 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℃离心 20min，取上清液置冰上待测。
- 3、血清等液体：直接测定。

ADH 测定操作：

1. 分光光度计预热 30 min，调节波长到 340 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂二在 25℃水浴中保温 30 min。
3. 空白管：在 1mL 石英比色皿中依次加入 100μL 蒸馏水、800μL 试剂二和 100μL 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。ΔA 空白管=A1-A2。
4. 测定管：在 1mL 石英比色皿中依次加入 100μL 上清液、800μL 试剂二和 100μL 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 A3 和 A4。ΔA 测定管=A3-A4。

注意：空白管只需测定一次。

计算公式：

(1) 按照蛋白浓度计算

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。

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

(2) 按照样本质量计算

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

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

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

(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。

$$\begin{aligned} \text{ADH } (\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \\ &\quad \text{样总}) \div T \\ &= 1.61 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(4) 按液体体积计算

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

$$\begin{aligned} \text{ADH } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) &= [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div V \text{ 样} \div T \\ &= 1.61 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \end{aligned}$$

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, 1000μL=0.001 L; 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. 上清液蛋白质浓度需要另外测定, 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。
2. 配制好的试剂二 3 天使用完。