

乙醇脱氢酶（ADH）活性测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

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/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板、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。

试剂三：粉剂×2瓶，-20℃保存，临用前每瓶加入9mL试剂二，现配现用。

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/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℃水浴中保温30 min。
3. 在微量石英比色皿/96孔板中依次加入20μL样本上清液、160μL试剂三和20μL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℃中每毫克蛋白每分钟氧化1nmol NADH 为1个酶活单位。

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

$$= 1608 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

（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。

$$\begin{aligned} \text{ADH (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1608 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{ADH (nmol/min/104cell)} &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109) \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1608 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{ADH (nmol/min/mL)} &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109) \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 1608 \times \Delta A \end{aligned}$$

ϵ : NADH摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1 cm ; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $200 \mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$; 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, 1 min 。

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。

$$\begin{aligned} \text{ADH (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109) \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 3215 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{ADH (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 3215 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{ADH (nmol/min/104cell)} &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109) \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 3215 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{ADH (nmol/min/mL)} &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109) \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 3215 \times \Delta A \end{aligned}$$

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, 1 min 。

