

乙醇脱氢酶（ADH）检测试剂盒（微量法）

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。

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 测定步骤：

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。

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

$$=1608 \times \Delta A \div Cpr$$

(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 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} ADH (\text{nmol/min/g 鲜重}) &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9) \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 1608 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：25℃中每 10⁴个细胞每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} ADH (\text{nmol/min}/10^4\text{cell}) &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9) \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 1608 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(4) 按液体体积计算

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

$$\begin{aligned} ADH (\text{nmol/min/mL}) &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9) \div V \text{ 样} \div T \\ &= 1608 \times \Delta A \end{aligned}$$

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, 200μL=2×10⁻⁴L;

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。

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℃中每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} ADH (\text{nmol/min/mg prot}) &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9) \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 3215 \times \Delta A \div Cpr \end{aligned}$$

(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 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} ADH (\text{nmol/min/g 鲜重}) &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9) \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 3215 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：25℃中每 10⁴个细胞每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} ADH (\text{nmol/min}/10^4\text{cell}) &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9) \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 3215 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(4) 按液体体积计算

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

$$\begin{aligned} ADH (\text{nmol/min/mL}) &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9) \div V \text{ 样} \div T \\ &= 3215 \times \Delta A \end{aligned}$$

ε: NADH 摩尔消光系数, 6.22×10³L/mol/cm;

d: 96 孔板光径, 0.5 cm;

V 反总: 反应体系总体积, 200μL=2×10⁻⁴L;

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。