

## 乙醇脱氢酶(ADH)检测试剂盒(乙醛微板法)

### 产品简介

乙醇脱氢酶(Alcohol dehydrogenase, ADH)的系统名为乙醇: 辅酶I氧化还原酶 (alcohol: NAD<sup>+</sup> oxidoreductase), 大量存在于人和动物肝脏、植物及微生物细胞之中, 是一种含锌金属酶, 具有广泛的底物特异性。乙醇脱氢酶能以烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)为辅酶, 催化伯醇和醛之间的可逆反应:  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{CHO} + \text{NADH} + \text{H}^+$ 。在人和哺乳动物体内, 乙醇脱氢酶与乙醛脱氢酶(ALDH)构成了乙醇脱氢酶系, 参与乙醇代谢, 是人和动物体内重要的代谢酶, 作为生物体内主要短链醇代谢的关键酶, 它在很多生理过程中起着重要作用; 丙酮酸脱羧酶(PDC)、乙醇脱氢酶(ADH)是乙醇发酵途径的关键酶, 无氧呼吸途径代谢产物的过程积累对细胞产生毒性, 影响线粒体结构和三羧酸循环的相关酶活性。

乙醇脱氢酶(ADH)检测试剂盒(乙醛微板法)检测原理是在弱碱条件下, 以乙醛为底物, 乙醛在ADH催化下被NADH还原为乙醇, ADH每催化1分子乙醛消耗1分子NADH, 通过分光光度比色法(酶标仪)测定340nm处吸光度的变化, 计算出NADH的消耗速率进一步推算出乙醇脱氢酶活性水平, 主要用于检测植物样本、血清等中乙醇脱氢酶活性。该试剂盒仅用于科研领域, 不适用于临床诊断或其他用途。

### 产品组成

名称 \ 编号	ADS057TE0 100T	Storage
试剂(A): ADH Lysis Buffer	250ml	4°C
试剂(B): PMSF	1ml	-20°C
试剂(C): ADH Assay Buffer	20ml	RT
试剂(D): NADH	1支	-20°C
试剂(E): ddH <sub>2</sub> O	1ml	RT
试剂(F): ADH 启动剂	1ml	4°C 避光
使用说明书	1份	

### 自备材料

- 1、研钵或匀浆器
- 2、离心管或试管
- 3、低温离心机

#### 4、96孔板、酶标仪

#### 操作步骤(仅供参考)

- 1、配制ADH Lysis Buffer工作液：取出ADH Lysis Buffer和PMSF，恢复至室温，按 ADH Lysis Buffer：PMSF=499：1的比例混合，即为ADH Lysis buffer工作液；即配即用，不宜久置，否则蛋白酶抑制剂 PMSF 的效率会有所下降。
- 2、准备样品：
  - ①植物样品：取0.5g植物组织(根系)清洗干净，切碎，按植物组织：ADH Lysis Buffer工作液=0.5g：2ml的比例，加入预冷的ADH Lysis Buffer工作液，冰浴情况下充分匀浆或研磨，4℃ 12000g离心20min，留取上清液即为乙醇脱氢酶粗提液；短期4℃保存待用，长期-20℃冻存待用。
  - ②血浆、血清和尿液样品：血浆、血清按照常规方法制备后可以直接用于该试剂盒的测定，-20℃冻存，用于乙醇脱氢酶的检测。
  - ③细胞或组织样品：取恰当细胞或组织裂解液，如有必要用ADH Lysis Buffer工作液进行适当匀浆，4℃12000g离心20min，取上清液，-20℃冻存，用于乙醇脱氢酶的检测。
  - ④高活性样品：如果样品中含有较高活性的乙醇脱氢酶，可以使用ADH Lysis Buffer工作液进行恰当的稀释。
- 3、配制NADH工作液：取出1支NADH，恢复至室温，准确溶解于1ml ddH<sub>2</sub>O，混匀，4℃预冷备用，-20℃保存1周有效。注意：该NADH工作液为过量。
- 4、配制ADH Assay Buffer工作液：取出ADH Assay Buffer、NADH工作液，恢复至室温，按ADH Assay Buffer：NADH工作液=8000：1的比例混合，即为ADH Assay Buffer工作液；该液最好即配即用，4℃预冷备用，-20℃保存1周有效。
- 5、ADH加样：按照下表设置对照孔(备选，一般可以不设对照孔)、测定孔，溶液应按照顺序依次加入，并注意避免产生气泡。如果样品中的乙醇脱氢酶活性过高，可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定，样品的检测最好能设置平行孔。

加入物(μl)	对照孔(备选)	测定孔
ADH Lysis Buffer 工作液	5	—
待测样品	—	5
ADH Assay Buffer 工作液	200	200

- 6、ADH测定：加入ADH启动剂2μl，立即以酶标仪测定340nm处吸光度(记为A<sub>0</sub>)并同时计时，每隔30s测定1次340nm处吸光度，其中至1min时340nm处吸光度记为A<sub>1</sub>，记录

其变化。建议加入ADH启动剂后立即检测，加样时间越短越好，其反应基本在1~2min内，其后反应趋于平缓。

注意：该反应系统是利用速率变化，求得相应OD的变化，进而推算出NADH的消耗速率，再进一步推算出乙醇脱氢酶的量，因此加入ADH启动剂立即计时很重要，每次检测指标不宜过多，否则有可能由于操作时间有差异进而导致结果偏差。

**计算：**乙醇脱氢酶活性定义：每分钟NADH氧化吸光度变化0.01为1个酶活力单位。液体样品ADH(U/ml·min)= $\Delta A / (0.01 \times t \times 0.005)$

式中： $\Delta A = A_0 - A_1$  (如有必要，可再减去对照最初1min的吸光度变化量)

0.01 = 每分钟NADH氧化吸光度变化0.01为1个酶活力单位

t = 检测时间(min) = 1

0.005 = 待测样品体积(ml)

组织样品ADH(U/g·min)= $\Delta A / (0.01 \times t \times W)$

式中： $\Delta A = A_0 - A_1$  (如有必要，可再减去对照最初1min的吸光度变化量)

0.01 = 每分钟NADH氧化吸光度变化0.01为1个酶活力单位

t = 检测时间(min) = 1

W = 待测样品鲜重或干重(g)

组织或植物粗酶液获得率(ml) = 上清液体积(ml) / 组织或植物质量 × 100%

### 注意事项

- 1、实验材料应尽量新鲜，如取材后不立即使用，应存于-20~-80℃。
- 2、待测样品中不能含有磷酸酶抑制剂，同时需避免反复冻融。
- 3、如果没有酶标仪，也可以使用普通的分光光度计测定，但应考虑分光光度计的最小检测体积。
- 4、该反应系统是利用速率变化，求得相应OD的变化，进而推算出NADH的消耗速率，再进一步推算出乙醇脱氢酶的量，因此加入ADH启动剂立即计时很重要，每次检测指标不宜过多，否则有可能由于操作时间有差异进而导致结果偏差。
- 5、酶液的稀释度应尽量控制在A340/min下降范围在0.1-0.2之间，以便减少实验误差。
- 6、 $\Delta A$ 为反应最初1min内340nm处吸光度变化的绝对量，如有必要可减去对照液最初1min的吸光度变化量。
- 7、所测待测样品的浓度过高，应用ADH Lysis Buffer工作液稀释样品后重新测定。

**有效期：**6个月。低温运输，按要求保存。