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+ 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。乙醇脱氢酶够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： CH3CH2OH+ NAD+ → CH3CHO +NADH+ 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，参乙醇脱氢酶与体内乙醇代谢，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：

编号 / 名称	GCTE0471 100T	Storage
试剂(A): ADH Lysis Buffer	250ml	4℃ 避光
试剂(B): PMSF	1ml	-20℃
试剂(C): ADH Assay Buffer	20ml	RT
试剂(D): NADH	1 支	-20℃
试剂(E): ddH_2O	1ml	RT
试剂(F): ADH 启动剂	1ml	4℃ 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_2O， 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_0)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_1， 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)=ΔA/(0.01×t×0.005)

式中：ΔA=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)=ΔA/(0.01×t×W)

式中：ΔA=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，以减少实验误差。

6、 ΔA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 个月有效。