乙醇脱氢酶(ADH)检测试剂盒(乙醛比色法)

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(乙醛比色法)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(分光光度计)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	GCTE0473 50T	Storage
试剂(A): ADH Lysis Buffer	250ml	4℃
试剂(B): PMSF	1ml	-20℃
试剂(C): ADH Assay Buffer	100ml	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、离心管或试管、低温离心机、比色杯、分光光度计

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 1g 植物组织(根系)清洗干净，切碎，按植物组织：ADH Lysis Buffer 工作液=1g：4ml 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：按照下表设置对照管(备选，一般可以不设对照管)、测定管，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管。

加入物(ml)	对照管(备选)	测定管
ADH Lysis Buffer	0.025	—
待测样品	—	0.025
ADH Assay Buffer 工作液	2	2

6、ADH 测定:加入 ADH 启动剂 0.02ml,立即以分光光度计(比色杯光径 1cm)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)=Δ*A*/(0.01×t×0.025)

式中：Δ*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

0.025=待测样品体积(ml)

组织样品 ADH(U/g・min)=Δ*A*/(0.01×t×W)

式中：Δ*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、 如果没有分光光度计，也可以使用普通的酶标仪测定，但应考虑酶标仪的最大检测体积。
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 A_{340}/min 下降范围在 0.1~0.2 之间，以便减少实验误差。
6、 Δ*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、 如果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。
8、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
9、 试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

有效期：6 个月有效。低温运输，按要求保存。

相关产品：

产品编号	产品名称
GCDF0135	组织细胞固定液(4% PFA)
GCTO1013	丙二醛(MDA)检测试剂盒(TBA 比色法)
GCTC1167	尿素(Urea)检测试剂盒(脲酶波氏比色法)