

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。乙醇脱氢酶能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: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{CHO} + \text{NADH} + \text{H}^+$ 。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。

Leagene 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	TE0471 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 ₂ 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、离心管或试管、低温离心机、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, 离心 20min, 留取上清液即为乙醇脱氢酶粗提液; 短期 4°C 保存待用, 长期 -20°C 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°C 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, 离心 20min, 取上清液, -20°C 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 ddH₂O, 混匀, 4°C 预冷备用, -20°C 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°C 预冷备用, -20°C 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。Leagene 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 $ADH(U/ml \cdot min) = \Delta A / (0.01 \times t \times 0.005)$

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 $ADH(U/g \cdot min) = \Delta A / (0.01 \times t \times W)$

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°C。
- 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、 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。
- 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。