



乙醇脱氢酶(ADH)测试盒说明书(精简版)

(货号: A083-2-1 测组织 紫外比色法 50管/48样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 测试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

一、测定原理:

利用乙醇脱氢酶(ADH)催化氧化型辅酶 I 反应的原理, 通过测定 340nm 处吸光度的变化率得出其酶活性。

二、测定意义:

样本激发乙醇脱氢酶时, 95%的(ADH)酶存在于肝小叶中心区, 在肝细胞浆中占 80~90%, 小部分存在于微粒中。

三、试剂的组成和配制: (试剂盒有效期 3 个月)

试剂一: 20mL 液体×1 瓶, 4℃保存, 临用前用双蒸水 1:1 稀释配成应用液使用。

试剂二: 液体×1 瓶, 4℃保存。

试剂三: 粉剂×4 支, -20℃以下保存。临用前每瓶粉剂用 10mL 双蒸水溶解配制成应用液, -20℃可保存 1 周左右。

四、所需仪器及试剂:

可调 340nm 波长的紫外分光光度计及 0.5cm 光径石英比色皿, 涡旋混匀器, 离心机, 37℃水浴锅, 秒表, 蒸馏水, 生理盐水, 蛋白测定试剂 (本公司有售)。

五、操作步骤:

1、样本前处理:

10%组织匀浆液的制备: 准确称取组织重量, 按照重量 (g): 体积(mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆, 2500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液进行测定。

2、操作表:

	空白管	测定管
试剂一应用液(mL)	0.65	0.65
试剂二(mL)	0.05	0.05
试剂三应用液(mL)	0.75	0.75
混匀, 37℃预温 10 分钟		
待测样本(mL)		0.05
双蒸水 (mL)	0.05	
样本与试剂混合的同时开始记时, 且立即混匀, 15 秒时, 340nm 处, 0.5cm 光径, 测定 OD 值 A1, 迅速将反应液置于 37℃水浴锅中, 10 分 15 秒时测定 OD 值 A2, 计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。		

3、详细操作步骤:

工作液的配制: 按试剂一应用液: 试剂二: 试剂三应用液 = 0.65 : 0.05 : 0.75 的比例配制, 用多少配多现用现配。

①、将紫外分光光度计于 340nm 处, 0.5cm 光径石英比色皿, 用双蒸水调零; (石英比色皿准备两只, 一只用于调零, 一只用于测定)。

②、往相应编号的试管中加入 50μL 匀浆上清液, 吸取工作液 1.45mL 冲入试管中, 快速混匀, 并计时; (空白管取双蒸水 50μL, 吸取工作液 1.45mL 冲入试管中, 快速混匀, 并计时, 其它操作与测定管相同)

③、迅速倒入石英比色皿中, 紫外分光光度计, 340nm 处比色, 15 秒时读取吸光度值 A₁;

④、将此比色液倒入原试管中置 37℃准确水浴 10 分钟, 再迅速倒入石英比色皿中, 10 分 15 秒时读取吸光度值 A₂;

⑤、求出 2 次吸光度差值 ($\Delta A = A_2 - A_1$)。

六、计算:

1、定义: 在 37℃条件下, 每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1nmol 产物的酶量定义为一个酶活力单位

2、组织中乙醇脱氢酶(ADH)计算公式:

$$\text{ADH 活力 (U/mgprot)} = \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{6.22 \times 0.5} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \div T \times 1000 \div \text{Cpr}$$

V_{反应}: 反应液总体积 (1.5mL);

V_样: 样本取样量 (0.05mL);

T: 反应时间 (10 分钟);

Cpr: 样本蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白)。

七、注意事项:

- 1、正常情况下, 样本中 ADH 酶含量较低, 测定时可能不会有明显的 OD 值变化, 属正常情况;
- 2、分光光度计测定两次 OD 值前都需要用蒸馏水调零, 以降低仪器带来的误差;
- 3、样本反复冻融、匀浆后不及时测定也会影响 (降低) 其酶活性。