



乙醇脱氢酶(ADH)测试盒说明书(精简版)

(货号: A083-1-1 测血清、血浆 50 管/48 样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书,预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、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,应用液的配制:临用前用双蒸水 1:1 稀释即可。

试剂二: 3mL 液体×1 瓶, 4℃保存。

试剂三: 粉剂×4 瓶, -20℃以下保存。临用前每瓶用 10mL 双蒸水配制成试剂三应用液,-20℃保存。

三、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。

四、操作步骤:

	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		
血清(浆)(mL)		0.05
双蒸水(mL)	0.05	
加入样本的同时开始计时,充分混匀,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, 20 分 15 秒时取出, 测定 OD 值 A2。计算 $\Delta A=A_2-A_1$ 。		

五、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(最好用之前配制,配完即用)。

- 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 50 μ L 新鲜血清(浆), 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 50 μ L, 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 20 分钟, 再迅速倒入石英比色皿中, 20 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、血清(浆)中乙醇脱氢酶(ADH)活力计算:

1、定义: 在 37℃条件下, 每毫升血清(浆)每分钟催化产生 1nmol 产物的酶量定义为一个酶活力单位

2、血清(浆)中乙醇脱氢酶(ADH)活力计算公式:

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

V_{反总}: 反应液总体积, 1.5mL;

V_样: 样本取样量, 0.05mL;

T: 反应时间, 20 分钟。

七、测定意义:

95%的乙醇脱氢酶(ADH)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。