

CheKine™ 乙醇脱氢酶 (ADH) 活性检测试剂盒 (微量法)

货号: KTB3030

规格: 48 T/48 S

96 T/96 S

批号: 见产品标签

	适用样本: 动植物组织、细菌、血清 (浆)
	保质期: 4℃, 避光保存 12 个月

01 背景与原理

乙醇脱氢酶 (ADH, EC 1.1.1.1) 是生物体内短链醇代谢的关键酶, 催化乙醇与乙醛的可逆转换, 在很多生理过程中起着重要作用。哺乳动物 ADH 主要在肝脏生成, 肝脏损伤导致 ADH 释放到血清中。血清 ADH 活性的高低反映了肝功能是否异常。

本试剂盒检测原理是 ADH 催化乙醇和 NAD⁺ 生成 NADH 以及乙醛, NADH 可以使 WST-8 转化为橙黄色的 Formazan, 在 450 nm 处有最大吸收峰, 测定 450 nm 吸光度的上升速率, 计算 ADH 的活性。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	60 mL	120 mL	4℃
Reagent I	4.5 mL	9 mL	4℃
Reagent II	2.25 mL	4.5 mL	4℃, 避光保存
Reagent III	Powder×2 vials	Powder×2 vials	4℃
Standard	0.5 mL	1 mL	4℃

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10% 的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 450 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	去离子水	试剂配制用
其他	匀浆器（组织样本）、恒温箱、冰盒、低温离心机、 可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有 助于提高实验效率

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Reagent I	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Reagent II	即用型；使用前平衡到室温	4℃，避光保存
Working Reagent III	临用前配制；96T 每瓶加入 5 mL 去离子水，48T 每瓶加入 2.5 mL 去离子水，充分混匀待用	未用完的试剂分装后-20℃避光保存两周，避免反复冻融
Standard	即用型；使用前平衡到室温	浓度为 10 mmol/L

05-1-2 标准品配制

使用 10 mmol/L 的 Standard，按照下表所示，用去离子水进一步稀释标准品。每次实验都要做一次标准品检测，制作标曲；稀释后的标准品溶液不稳定，必须在 4 小时内使用。

序号	标准品 (μL)	去离子水 (μL)	浓度 (μmol/L)
1	20 μL 10 mmol/L Standard	80	2000
2	50 μL of 2000 μmol/L	50	1000
3	50 μL of 1000 μmol/L	50	500
4	50 μL of 500 μmol/L	50	250
5	50 μL of 250 μmol/L	50	125
6	50 μL of 125 μmol/L	50	62.5
7	50 μL of 62.5 μmol/L	50	31.25
空白	0	50	0

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本。测定过程中，样本在冰上放置，以免酶活降低。

- **动植物组织**：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL Extraction Buffer，冰浴匀浆，12000 g，4℃离心 10 min，取上清液，置冰上待测。组织样本建议以 Extraction Buffer 稀释 5 倍后检测。
- **细菌样本**：收集 1×10^9 个细菌，加入 1 mL Extraction Buffer，冰浴超声波破碎 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），然后 12000 g，4℃离心 10 min，取上清液，置冰上待测。
- **血清（浆）样本**：直接检测。

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 450 nm。
2. **Working Solution 配制**：临用前配制；按照 Reagent I：Reagent II：Working Reagent III=2：1：2 的比例混匀待用，每个反应需要 Reagent I，Reagent II，Working Reagent III 的量分别为 60 μL，30 μL，60 μL。
3. **检测体系配制**：在 96 孔板中按照如下方式操作，空白管只需要做 1-2 次。实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

试剂	空白孔 (μL)	标准孔 (μL)	测定孔 (μL)
去离子水	10	0	0
Standard	0	10	0
样本	0	0	10
Working Solution	150	150	150

4. **吸光度检测**：迅速混匀，空白孔与标准孔测定 450 nm 处 300 s 时的吸光值 $A_{\text{空白}}$ 和 $A_{\text{标准}}$ ，测定孔检测 450 nm 处 300 s 时的吸光值 $A_{1\text{测定}}$ 与 600 s 时的吸光值 $A_{2\text{测定}}$ 。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn)>进入“技术中心”>查找“在线计算器”工具。



06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算 $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{测定}} = A_{2\text{测定}} - A_{1\text{测定}}$ 。

2. 标准曲线绘制

以标准品浓度为 y 轴， $\Delta A_{\text{标准}}$ 为 x 轴，绘制标准曲线。将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 代入方程得到 y 值 ($\mu\text{mol/L}$)

3. 样本 ADH 活性计算

● 按样本质量计算

单位的定义：每 g 组织每分钟消耗 1 μmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ADH (U/g)} = y \times V_{\text{样本}} \div T \div V_{\text{样本}} \times V_{\text{提取}} \div W = 2 \times 10^{-4} \times y \div W$$

● 按细菌密度计算

单位的定义：每 10^9 个细菌每分钟消耗 1 μmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ADH (U/10}^9\text{)} = y \times V_{\text{样本}} \div T \div V_{\text{样本}} \times V_{\text{提取}} \div N = 2 \times 10^{-4} \times y \div N$$

● 按血清（浆）体积计算

单位的定义：每升血清（浆）每分钟消耗 1 μmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ADH (U/L)} = y \times V_{\text{样本}} \div T \div V_{\text{样本}} = 0.2 \times y$$

● 按蛋白浓度数量计算

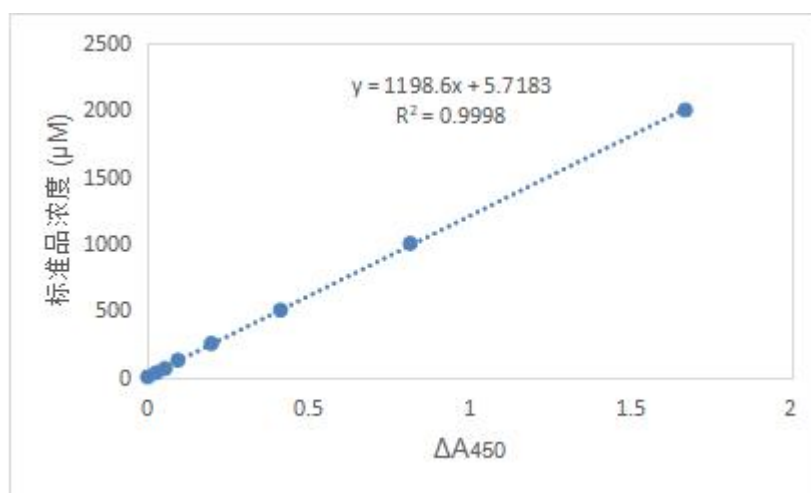
单位的定义：每 g 组织蛋白每分钟消耗 1 μmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ADH (U/g prot)} = y \times V_{\text{样本}} \div T \div V_{\text{样本}} \div \text{Cpr} = 0.2 \times y \div \text{Cpr}$$

$V_{\text{提取}}$ ：加入 Extraction Buffer 体积， 1×10^{-3} L； $V_{\text{样本}}$ ：加入样本体积， 1×10^{-5} L；Cpr：蛋白浓度 (g/L)；T：反应时间，5 min；W：样本质量，g；N：细菌数量，以 10^9 为单位（例如细菌数量为 1×10^9 ，N=1）。

07 结果展示

典型标准曲线： $y = 1198.6x + 5.7183$ ， $R^2 = 0.9998$



示例-1: 取 0.1 g 兔肝脏，匀浆后上清液稀释 5 倍检测，按照测定步骤操作。测得 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{2\text{测定}} - A_{1\text{测定}} = 0.546 - 0.387 = 0.159$ ，代入标准曲线，计算 $y = 196.296$ 。计算稀释 5 倍后的兔肝脏匀浆上清酶活结果为：ADH (U/g) = $2 \times 10^{-4} \times y \div W = 0.393$ U/g。

08 FAQ

● 检测得到的样本 $\Delta A_{\text{测定}}$ 过高或者过低怎么办？

如果样本 $\Delta A_{\text{测定}} > 1.0$ ，可用 Extraction Buffer 适当稀释或减少提取用样本量，重新进行测定。如果样本的 $\Delta A_{\text{测定}} < 0.02$ ，可提高样本量或延长 $A_{2_{\text{测定}}}$ 的测量时间到 900 s，计算公式中的 T 相应替换为 10 min。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB3020	CheKine™ NADP-苹果酸脱氢酶（NADP-MDH）活性检测试剂盒（微量法）
KTB3021	CheKine™ NAD-苹果酸脱氢酶（NAD-MDH）活性检测试剂盒（微量法）

CheKine™ 乙醇脱氢酶 (ADH) 活性检测流程示意图

(Abbkin 货号：KTB3030)

