



乙醇脱氢酶活性检测试剂盒 (50T)

产品说明

乙醇脱氢酶(ADH) 是一个酶家族, 可以催化醇转化为醛的反应, 同时将 NAD^+ 还原为 NADH 。人体有 9 种 ADH 的同工酶, 具有 ADH 活性的酶类主要存在于肝脏。ADH 家族成员是涉及醇去毒作用的主要酶。ADH 酶的遗传变异会导致 ADH 活性的差异和酒精耐受性, 可调节酒精中毒易感性。本公司的非放射性比色 ADH 测定是基于四唑盐 MTT 在 NADH 偶联的酶促反应中被还原成 MTT 的还原形式, 并在 565nm 处显示出吸收最大值。在 565nm 处的吸光度的增加与酶的活性成正比。线性检测范围 (20 μL 样品): 0.4 至 80 U/L。

适用性

适用于各种样品中乙醇脱氢酶的检测, 包括组织、细胞和血清。

试剂盒组成(96 孔板供 100 份检测)

缓冲液:	6 mL	心肌黄酶:	60 μL
NAD溶液:	0.5 mL	MTT 溶液:	0.75 mL
底物:	1 mL	校准液:	1.5mL

保存: 所有试剂均在 -20°C 保存。

检测步骤

这种测定是以动力学反应为基础的。为确保相同的孵化时间, 向样品中加入工作试剂的速度要快, 搅拌时间要短但要彻底。建议使用多通道移液器。检测可以在任何需要的温度下进行 (如 25°C 或 37°C)。

一、样本制备:

血清和血浆直接进行检测。

组织: 在解剖前, 用磷酸盐缓冲盐水 (pH7.4) 冲洗组织以去除血液。在含有 50mM 磷酸二氢钾 (pH7.5) 的约 200 μL 缓冲液中匀浆组织 (50mg)。在 4°C 下以 10,000 x g 离心 15 分钟。取上清液进行检测。

细胞裂解液: 在 4°C 下以 2,000 x g 离心 5 分钟, 收集细胞。对于粘附细胞, 不要用蛋白水解酶来收获细胞, 而是用刮除器。在含有 50mM 磷酸二氢钾 (pH7.5) 的适当体积的冷缓冲液中匀浆或超声处理细胞。在 4°C 以 10,000 x g 离心 15 分钟。取上清液进行检测。

所有样品可在 -20°C 至 -80°C 下保存至少一个月。

二、反应试剂准备:

将试剂放置到所需的反应温度 (如 25°C 或 37°C)。在使用前对试剂进行简单的离心。

反应试剂 (WR) 的制备方法是: 为每个 96 孔反应混合 5 μL 底物、14 μL MTT 溶液、9 μL NAD 溶液、1 μL 心肌黄酶和 55 μL 缓冲液。

空白反应试剂 (BWR) 的制备方法是: 为每一个 96 孔的试验混合 14 μL MTT 溶液, 9 μL NAD 溶液, 1 μL 心肌黄酶和 60 μL 缓冲液 (即无底物)。

三、反 应:

1. 将 100 μL 水 ($\text{OD}_{\text{H}_2\text{O}}$) 和 100 μL 校准液 (OD_{CAL}) 溶液转移到透明平底 96 孔板的孔中。
2. 将 20 μL 样品转移到 2 个独立的孔中。在一个样品孔中加入 80 μL WR, 在另一个样品孔中加入 80 μL BWR。短暂敲击板混合。
3. 在酶标仪上读取 $\text{OD}_{565\text{nm}}$ (OD_0), 并在 30 分钟后再次读取 (OD_{30})。



3. 在酶标仪上读取 OD_{565nm} (OD₀), 并在 30 分钟后再次读取 (OD₃₀)。

四、计算

用 OD₃₀ 减去每个样品和样品空白孔的 OD₀, 分别计算出 ΔOD_S 和 ΔOD_B 值。然后, ADH 活性可按以下公式计算:

$$\begin{aligned} \text{ADH Activity} &= \frac{\Delta\text{OD}_S - \Delta\text{OD}_B}{\epsilon_{\text{mtt}} \cdot l} \times \frac{\text{Reaction Vol } (\mu\text{L})}{t \text{ (min)} \cdot \text{Sample Vol } (\mu\text{L})} \times n \\ &= \frac{273}{t \text{ (min)}} \times \frac{\Delta\text{OD}_S - \Delta\text{OD}_B}{\text{OD}_{\text{CAL}} - \text{OD}_{\text{H}_2\text{O}}} \times n \quad (\text{U/L}) \end{aligned}$$

其中 ϵ_{mtt} 是还原 MTT 的摩尔吸收系数。l 是光的路径长度, 由校准器计算得出。OD_{CAL} 和 OD_{H₂O} 是校准液和水的 OD_{565nm} (OD₀) 值。t 是反应时间 (建议时间为 30 分钟)。反应体积和样品体积分别为 100 μL 和 20 μL。n 是稀释系数。

单位定义: 在 pH 值为 8.2 的条件下, 1 单位 (U) 的 ADH 每分钟将催化 1 微摩尔的乙醇转化为乙醛。

备注 如果样品 ADH 活性超过 80 U/L, 可以使用较短的反应时间, 或者将样品在水中稀释并重复检测。对于 ADH 活性 < 1 U/L 的样品, 孵化时间可延长至 2 小时。

注意事项

本产品仅供研究用, 使用过程中应严格遵循实验安全措施。

