

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K763-M

产品规格: 48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器: 酶标仪(440-460 nm)

Elabscience®乙醇脱氢酶(ADH)比色法测试盒

Alcohol Dehydrogenase (ADH) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清(浆)、动物组织等样本中乙醇脱氢酶(ADH)的活力。

检测原理

乙醇脱氢酶(ADH)是乙醇氧化还原酶,是生物体短链醇代谢的关键酶,催化乙醇与乙醛可逆转换,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 活性变化与酒精性肝细胞损伤、肝炎、肝硬化等现象有密切相关性。乙醇脱氢酶催化乙醇氧化脱氢,同时 NAD^+ 被还原生成 NADH, NADH 在递氢物质的作用下使 WST-8 显橙黄色,通过测定 450 nm 下吸光值变化可测得乙醇脱氢酶酶活。

本试剂盒测定组织样本时,需测定总蛋白浓度,推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	底物 (Substrate)	1.5 mL×1 支	1.5 mL×2 支	-20°C 保存 3 个月
试剂二 (Reagent 2)	辅酶 (Coenzyme)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 保存 3 个月
试剂三 (Reagent 3)	辅酶稀释液 (Coenzyme Diluent)	0.5mL×1 支	1 mL×1 支	-20°C 保存 3 个月
试剂四 (Reagent 4)	缓冲液 (Buffer Solution)	15 mL×1 瓶	30 mL×1 瓶	-20°C 保存 3 个月
试剂五 (Reagent 5)	显色剂 (Chromogenic Agent)	3 mL×1 瓶	6 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 3 个月
试剂六 (Reagent 6)	标准品 (Standard)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 保存 3 个月
	96 孔酶标板	1 板		
	96 孔覆膜	2 张		

	样本位置标记表	1 张	
--	---------	-----	--

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(440-460 nm，最佳检测波长 450 nm)，恒温箱(37°C)，4°C 离心机。

仪器：生理盐水(0.9% NaCl)。

试剂准备

① 检测前，试剂需平衡至室温。

② 试剂二工作液的配制：

取一支试剂二用 400 μ L 试剂三溶解，分装后-20°C 可保存 7 天。

③ 辅酶工作液的配制：

试剂二工作液：试剂四体积比为 1: 99 的比例混匀，置于冰盒上待用，现配现用，按需配制，可根据反应工作液用量进行配制，配好的辅酶工作液需在 0.5 h 内使用。

④ 反应工作液的配制：

按辅酶工作液：试剂一体积比为 7: 1 的比例配制反应工作液，现配现用，按需配制，配好的反应工作液需在 0.5 h 内使用。

⑤ 5 mmol/L 标准品储备液的配制：

每支试剂六加入 1 mL 试剂四充分溶解，分装后-20°C 可保存 5 天。

⑥ 250 μ mol/L 标准品溶液的配制：

按 5 mmol/L 标准品储备液：试剂四=1: 19 的体积比配制得到 250 μ mol/L 的标准品溶液，按需配制，配好的标准品溶液在 6 h 内使用有效。

⑦ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度($\mu\text{mol/L}$)	0	50	75	100	150	175	200	250
250 $\mu\text{mol/L}$ 标准品(μL)	0	40	60	80	120	140	160	200
试剂四(μL)	200	160	140	120	80	60	40	0

样本准备

① 样本处理

血清(浆)等液体样本：直接测定。

组织样本：取组织样本 0.1 g，用双蒸水冲洗表面，滤纸吸干，放入匀浆容器中，加入 0.9 mL 生理盐水(0.9% NaCl)，匀浆 60 s，4℃，10000 \times g 离心 10 min，取上清液置于冰上待测。留取部分上清样本进行蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.29-248 U/L，可参考下表进行稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%大鼠肺组织	不稀释	10%大鼠脾组织	不稀释
10%大鼠肝组织	2-4	10%大鼠心组织	1-3
10%小鼠肝组织	2-4	10%大鼠脑组织	1-3
小鼠血清	不稀释	猪血清	不稀释
人血清	不稀释	狗血清	不稀释

注：稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

实验关键点

- ① 反应过程全程避光。
- ② 配好的辅酶工作液需在 0.5 h 内使用完。

操作步骤

- ① 标准孔：取 20 μL 不同浓度的标准品溶液加入相应的酶标孔中。
测定孔：取 20 μL 待测样本加入测定孔中。
- ② 向步骤①中各孔依次加入 160 μL 反应工作液。
- ③ 向步骤③中各孔依次加入 40 μL 试剂五。
- ④ 振板 3 s，室温避光放置 2 min，酶标仪 450 nm 下检测各测定孔初始 OD 值 A_1 。
- ⑤ 37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育反应 15 min。
- ⑥ 酶标仪于 450 nm 波长检测各测定孔 OD 值 A_2 和各标准孔 OD 值，计算测定孔变化 OD 值 ΔA (注： $\Delta A = A_2 - A_1$ ，标准孔只需要检测 A_2 值)。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度的标准品溶液(μL)	20	--
待测样本(μL)	--	20
反应工作液(μL)	160	160
试剂五(μL)	40	40
振板 3 s，室温避光放置 2 min，酶标仪 450 nm 波长检测各测定孔初始 OD 值 A_1 。		
37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育反应 15 min，酶标仪于 450 nm 波长检测各测定孔 OD 值 A_2 和各标准孔 OD 值，计算测定孔变化 OD 值 ΔA (注： $\Delta A = A_2 - A_1$ ，标准孔只需要检测 A_2 值)。		

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

组织样本中 ADH 活力计算公式:

定义: 37℃ 条件下, 每克组织蛋白每分钟水解乙醇的过程还原 NAD^+ 生成 $1 \mu\text{mol}$ NADH 所需要的 ADH 酶量为一个活力单位。

$$\text{ADH 活性} \frac{(\text{U/gprot})}{=} (\Delta A_{450} - b) \div a \div T \div C_{\text{pr}} \times f$$

血清(浆)样本中 ADH 活力计算公式:

定义: 37℃ 条件下, 每升血清(浆)每分钟水解乙醇的过程还原 NAD^+ 生成 $1 \mu\text{mol}$ NADH 所需要的 ADH 酶量为一个活力单位。

$$\text{ADH 活性} \frac{(\text{U/L})}{=} (\Delta A_{450} - b) \div a \div T \times f$$

注解:

y: 标准孔 OD 值-空白孔 OD 值(标准曲线 OD 值只取 A_2 , 不需要测定 A_1 ; 标准品浓度为 0 时 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔA_{450} : 测定孔 A_2-A_1 的 OD 值

T: 孵育反应时间, 15 min

C_{pr} : 组织样本蛋白浓度: gprot/L

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

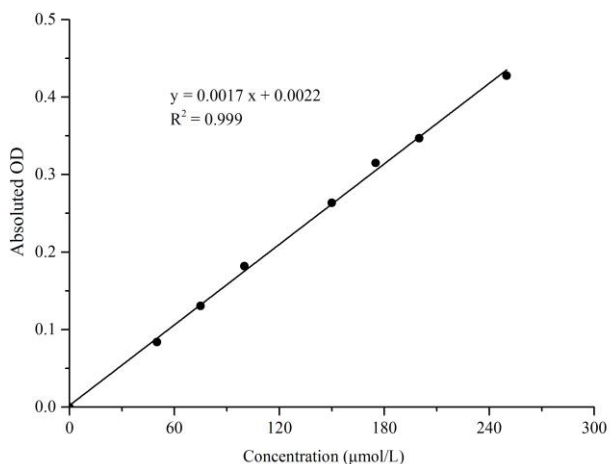
检测范围	0.29-248 U/L	平均批间差	4.5 %
灵敏度	0.29 U/L	平均批内差	4.2 %
回收率	102 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量20 μL ，按照操作步骤进行实验，各点OD值如下表所示：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	50	75	100	150	175	200	250
OD 值	0.063	0.147	0.198	0.247	0.321	0.373	0.418	0.494
	0.063	0.147	0.189	0.243	0.332	0.383	0.402	0.487
平均 OD 值	0.063	0.147	0.194	0.245	0.327	0.378	0.410	0.491
绝对 OD 值	0.000	0.084	0.131	0.182	0.264	0.315	0.347	0.428

②绘制标曲(如下图)：



附录2 实例分析

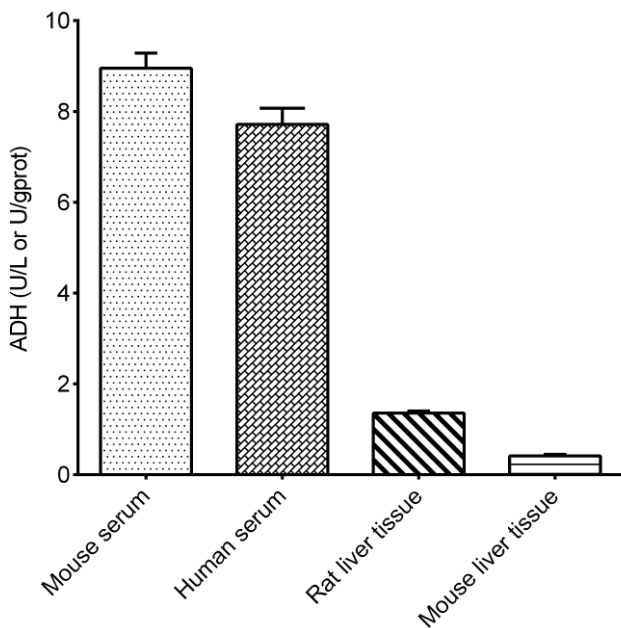
例如检测大鼠肝组织(数据仅供参考):

取稀释2倍的10%大鼠肝组织样本20 μL , 按操作表操作, 结果如下:

标准曲线: $y = 0.0017x + 0.0022$, 测定的OD值 A_1 为0.193, 反应15 min后测定OD值 A_2 为0.478, 10%大鼠肝组织匀浆蛋白浓度为8.14 gprot/L计算结果为:

$$\text{ADH 活力} = (0.478 - 0.193 - 0.0022) \div 0.0017 \div 15 \div 8.14 \times 2 = 2.72 \text{ U/gprot} \\ (\text{U/gprot})$$

按照说明书操作, 测定大鼠肝脏组织(10%匀浆蛋白浓度为6.58 gprot/L, 加样量20 μL , 样本稀释2倍)、小鼠肝脏组织(10%匀浆蛋白浓度为7.08 gprot/L, 加样量20 μL , 样本稀释2倍)、小鼠血清(加样量20 μL)和人血清(加样量20 μL)中ADH活力(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
复孔差异大	样本加入量差异较大	减小样本量差异
	反应体系有气泡	消除气泡或重新检测
样本测不出值	工作液放置时间太久	工作液按需配置，现配现用

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Zhang X, He C, Chen Y, et al. Cyclic reactions-mediated self-supply of H₂O₂ and O₂ for cooperative chemodynamic/starvation cancer therapy[J]. *Biomaterials*, 2021, 275:120987-. IF:12.479
2. Xia H, Scholtes C, Dufour CR, et al. Insulin action and resistance are dependent on a GSK3 β -FBXW7-ERR α transcriptional axis. *Nat Commun.* 2022; 13 (1):2105. IF:14.919
3. Liu Q, Zhang T X, Zheng Y D, et al. Calixarene-Embedded Nanoparticles for Interference-Free Gene-Drug Combination Cancer Therapy[J]. *Small*, 2021, 2006223. IF:11.459
4. He C, Zhang X, Chen C, et al. A solid lipid coated calcium peroxide nanocarrier enables combined cancer chemo/chemodynamic therapy with O₂/H₂O₂ self-sufficiency[J]. *Acta Biomaterialia*, 2021, 122. IF:8.203
5. Chen L, Tao F, Zhang Y, et al. Islet-cell autoantigen 69 accelerates liver regeneration by downregulating Tgfb1 and attenuating Tgf β signaling in mice[J]. *FEBS Letters*, 2020, 594(17). IF:6.665
6. Omar N, Frank J, Kruger J, et al. Effects of High Intakes of Fructose and Galactose, with or Without Added Fructooligosaccharides, on Metabolic Factors, Inflammation, and Gut Integrity in a Rat Model[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2021:2001133. IF:5.914
7. Wang C, Ma C, Fu K, et al. Phillygenin Attenuates Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis via Modulating Inflammation and Gut Microbiota[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 9, 21. IF:5.81
8. Du Y Q, Zheng Y Z, Yu C X M, et al. The Mechanisms of Yu Ping Feng San in Tracking the Cisplatin-Resistance by Regulating ATP-Binding Cassette Transporter and Glutathione S-Transferase in Lung Cancer Cells[J].*Frontiers in Pharmacology*, 2021; 12: 678126. IF:5.81
9. Zeng X Peng, Wang L J, Guo L H, et al. Dasatinib ameliorates chronic pancreatitis induced by caerulein via anti- fibrotic and anti-inflammatory mechanism[J]. *Pharmacological Research*, 2019, 147, 104357. IF:5.574
10. Cao X, Liang Y, Liu R, et al. Uncovering the Pharmacological Mechanisms of Gexia-Zhuyu Formula (GXZY) in Treating Liver Cirrhosis by an Integrative Pharmacology Strategy. *Front Pharmacol.* 2022; 13:793888. IF:5.331
11. Wang Y, Xie W, Feng Y, et al. Epithelial-derived exosomes promote M2 macrophage

- polarization via Notch2/SOCS1 during mechanical ventilation. *Int J Mol Med.* 2022; 50 (1). IF:5.314
12. Jung D S, Son Y J, Shin J M, et al. Gymnaster Koraiensis Extract Alleviated Metabolic Syndrome Symptoms and Stimulated UCP1-Independent Energy Consumption via AMPK Activation in White Adipose Tissue[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2020. IF:5.309
 13. Ali A K, Komal A K, Almutairi S M, et al. Natural killer cell-derived IL-10 prevents liver damage during sustained murine cytomegalovirus infection[J]. *Frontiers in immunology*, 2019, 10: 2688. IF:5.085
 14. Xu Y , Zhang Y , Xu Y , et al. Activation of CD137 signaling promotes macrophage apoptosis dependent on p38 MAPK pathway-mediated mitochondrial fission[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2021 Jul;136:106003. IF:5.085
 15. Naseh A, Shirin B, Maryam M, et al. Attenuation of chronic arsenic neurotoxicity via melatonin in male offspring of maternal rats exposed to arsenic during conception: Involvement of oxidative DNA damage and inflammatory signaling cascades[J]. *Life Sciences* 266 (2021) 118876. IF:5.037
 16. Ahmed A E, Alshehri A, Al-Kahtani M A, et al. Vitamin E and selenium administration synergistically mitigates ivermectin and doramectin-induced testicular dysfunction in male Wistar albino rats[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 124: 109841. IF:4.545
 17. Su S, Tian H, Jia X, et al. Mechanistic insights into the effects of SREBP1c on hepatic stellate cell and liver fibrosis[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020. IF:4.486
 18. Wang L J, He L, Hao L, et al. Isoliquiritigenin ameliorates caerulein-induced chronic pancreatitis by inhibiting the activation of PSCs and pancreatic infiltration of macrophages[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020. IF:4.486
 19. Dejan Lazić, Andreas Scheurer, Dušan Čočić, et al. New bis-pyrazolopyridine ruthenium(III) complex as a potential anticancer drug: In vitro and in vivo activity in murine colon cancer[J]. *Dalton Transactions*, 2021 Jun; 50(22):7686-7704. IF:4.39
 20. Li X, Lv Z, Chen J, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* B10 can alleviate liver apoptosis and oxidative stress induced by aflatoxin B1[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2021, 151:112124. IF:4.06
 21. Amany Abdel-Rahman Mohamed , Safaa I. Khater , Ahmed Hamed Arisha , et al. Chitosan-stabilized selenium nanoparticles alleviate cardio-hepatic damage in type 2

- diabetes mellitus model via regulation of caspase, Bax/Bcl-2, and Fas/FasL-pathway[J]. *Gene*, 2020, 768(7):145288. IF:3.688
22. Zhang S, Jiang L, Hu H, et al. Pretreatment of exosomes derived from hUCMSCs with TNF- α ameliorates acute liver failure by inhibiting the activation of NLRP3 in macrophage[J]. *Life Sciences*, 2020, 246: 117401. IF:3.647
 23. Yu H, Zhang L, Chen P, et al. Dietary bile acids enhance growth, and alleviate hepatic fibrosis induced by a high starch diet via AKT/FOXO1 and cAMP/AMPK/SREBP1 pathway in *Micropterus salmoides*[J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10. IF:3.367
 24. Sohini Sen, Shaunak Ghosh, Sayantan De, et al. Immunomodulatory and antimicrobial non-mulberry *Antheraea mylitta* silk fibroin accelerates in vitro fibroblast repair and regeneration by protecting oxidative stress[J]. *RSC Advances*, 2021 May; 11(31):19265-19282. IF:3.361
 25. Li Jianda, Yuan Chen, Liu Peng et al. Red blood cells serve as a vehicle for PEDV transmission.[J]. *Vet Microbiol*, 2021, 257: 109081. IF:3.293
 26. Chen L, Tao F, Zhang Y, et al. Islet-cell autoantigen 69 accelerates liver regeneration by downregulating Tgfb1 and attenuating Tgf β signaling in mice[J]. *FEBS Letters*, 2020. IF:3.057
 27. Cui Y, Wang Y, Liu G. Protective Effect of Barbaloin in a Rat Model of Myocardial Ischemia Reperfusion Injury Through the Regulation of the CNPY2?PERK Pathway[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2019. IF:2.928
 28. Sun Yan-Chun, Han Shi-Cheng, Yao Ming-Zhu, et al. High-throughput metabolomics method based on liquid chromatography-mass spectrometry: Insights into the underlying mechanisms of salinity-alkalinity exposure-induced metabolites changes in *Barbus capito*[J]. *Journal of Separation Science*, 2021 Jan; 44(2):497-512. IF:2.878
 29. Mustafa H N, Hegazy G A, El Awdan S A, et al. Liver ischemia/reperfusion injury, a setting in which the functional mass is reduced and the role of PDE5 inhibitor[J]. *Eur. J. Anat*, 2019, 23(5): 325-332. IF:2.638
 30. Chen L, Ma K, Fan H, et al. Exogenous hydrogen sulfide protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress and cell apoptosis.[J]. *Spandidos Publications*, 2021(2). IF:2.447