

乙醛脱氢酶 (acetaldehyde dehydrogenase, ALDH) 试剂盒说明书

(货号: G0828F 分光法 48 样)

一、产品简介:

乙醛脱氢酶 (ALDH, EC 1.2.1.10) 是醛脱氢酶的一种, 广泛存在于各种动物、植物和微生物体内。主要作用是将乙醛氧化成乙酸, 在酒精代谢中起主要作用。

本公司提供一种简单, 快速, 可靠的定量 ALDH 酶活性的方法。在这个测定中, 乙醛被 ALDH 氧化产生 NADH, 然后将无色探针还原成有色产物, 在 450nm 处具有强吸光度, 即可得到乙醛脱氢酶 (ALDH) 酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	粉体 mg×1 瓶	4°C 保存	临用前离心或甩几下使粉体落入底部, 再加 4.2mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	液体 2.5mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂三	液体 70mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂四	液体 μL×1 支	-20°C 保存	临用前取两支新的 EP 管, 向其中一支先加 1.1mL 蒸馏水, 再迅速吸取 0.1mL 的试剂四至蒸馏水中, 混匀备用。(该试剂极易挥发, 所以吸取操作时动作需迅速)
标准品	粉体 mg×1 支	4°C 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、可调式移液器、研钵、天平、离心机、蒸馏水。

四、乙醛脱氢酶 (ALDH) 酶活测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4°C 离心 10min, 取上清置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取

② 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30 min 以上, 调节波长到 450nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C), 依次在 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中加入:

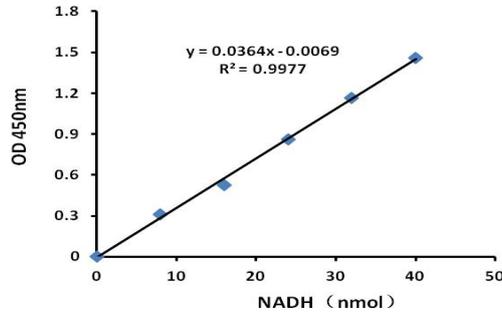
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	80	80
试剂一	40	40
试剂二	25	25
试剂三	615	655
试剂四	40	

混匀, 30s 时于 450nm 处读取各管吸光值 A1, 30min 后读取各管吸光值 A2, $\Delta A = (A2 - A1)$ 测定 - (A2 - A1) 对照 (每个样本需做一个自身对照)。

【注】若 ΔA 值在零附近徘徊, 可加大样本量 (如: 40 μ L, 则试剂三相应减少), 或者延长反应时间 T, 则改变后的样本体积 V1 和反应时间 T 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.0364x - 0.0069$; x 是 NADH 摩尔质量 (nmol), y 是 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克蛋白每分钟催化生成 1nmol NADH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{ALDH 酶活 (nmol/min/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0069) \div 0.0364] \div (\text{Cpr} \times V1 \div V) \div T \\ &= 11.45 \times (\Delta A + 0.0069) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按样本质量计算:

酶活定义: 每克样品每分钟催化生成 1nmol NADH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{ALDH 酶活 (nmol/min/g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0069) \div 0.0364] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 11.45 \times (\Delta A + 0.0069) \div W \end{aligned}$$

4、按液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体样本每分钟催化生成 1nmol NADH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{ALDH 酶活 (nmol/min/mL)} &= [(\Delta A + 0.0069) \div 0.0364] \div V1 \div T \\ &= 11.45 \times (\Delta A + 0.0069) \end{aligned}$$

V---加入提取液体积, 1 mL; V1---加入样本体积, 0.08mL;

T---反应时间, 30 min; W---样本质量, g;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (1nmol/ μ L): 向标准品 EP 管里面加入 1.41mL 蒸馏水 (母液需在两天内用且 -20 $^{\circ}$ C 保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. nmol/ μ L。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据对照管加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。