

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

(货号: G0828W 微板法 96 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 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	4℃保存	临用前离心或甩几下使粉体落入底部, 再加 2.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	液体 2mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 45mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 μL×1 支	-20℃保存	临用前取一支新的 EP 管, 向其中先加 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℃保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、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℃离心 10min, 取上清置冰上待测。s

【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 酶标仪预热 30 min 以上, 调节波长到 450nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25℃), 依次在 96 孔板中加入:

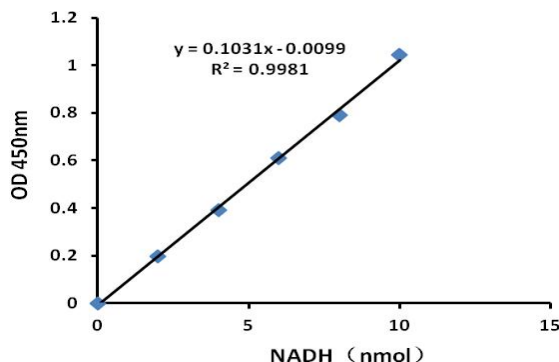
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	10	10
试剂二	10	10
试剂三	150	160
试剂四	10	

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： $y = 0.0364x - 0.0069$ ；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。

$$\begin{aligned}\text{ALDH 酶活}(\text{nmol/min/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0099) \div 0.1031] \div (\text{Cpr} \times V1 \div V) \div T \\ &= 16.17 \times (\Delta A + 0.0099) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned}\text{ALDH 酶活}(\text{nmol/min/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0099) \div 0.1031] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 16.17 \times (\Delta A + 0.0099) \div W\end{aligned}$$

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。

$$\text{ALDH 酶活}(\text{nmol/min/mL}) = [(\Delta A + 0.0099) \div 0.1031] \div V1 \div T = 16.17 \times (\Delta A + 0.0099)$$

V---加入提取液体积，1 mL； V1---加入样本体积，0.02 mL；

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。