

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

（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 1mL×1 支	-20℃保存	临用前取两支新的 EP 管, 向新 EP 管中先加 1.1mL 蒸馏水, 再迅速吸取 0.1mL 试剂四至该 EP 管中, 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。

【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 细菌/培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照数量（ 10^4 个）：提取液体积为 500~1000：1 的比例进行提取

- ③ 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。所有试剂解冻至室温（25℃）。

- ② 制备对照管样本：取出同一个样本的部分上清液至一新 EP 管中，于 95℃水浴中煮沸 10min 后取出，冷却至室温后于 12000rpm，4℃或者室温离心 10min，取离心后的上清液作为该样本的对照管样本备用。

③ 依次在 96 孔板中加入：

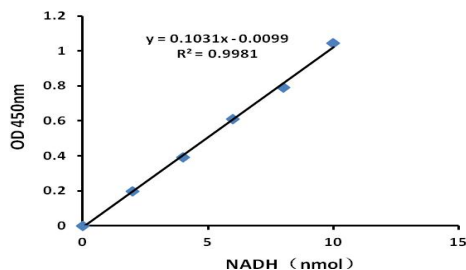
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20 (煮沸的样本)
试剂一	10	10
试剂二	10	10
试剂三	150	150
试剂四	10	10

混匀，30s 时在 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 值小于 0.01，可加大样本量 (如：40μL，则试剂三相应减少)，或者延长反应时间 T (如增至 60min)，则改变后的 V1 和 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。

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

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。

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

4、按细菌/细胞密度计算：

定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化生成 1nmol NADH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{ALDH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0099) \div 0.1031] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.03 \times (\Delta A + 0.0099)$$

5、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。

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

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 (1nmol/μL)：向标准品管里加 1.41mL 蒸馏水溶解 (母液需在两天内用且-20℃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/μL。
- 3 按照 20μL 各标准品浓度+10μL 试剂二+170μL 试剂三，混匀后孵育 5min 后于 450nm 处读值，根据结果即可制作标准曲线。