

## 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 1mL×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、水浴锅、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, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费!

#### 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 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°C 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 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 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°C 水浴中煮沸 10min 后取出, 冷却至室温后于 12000rpm, 4°C 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 试剂解冻至室温 (25°C), 或可放在 25°C 条件下水浴 5-15min。

④ 试剂一和二和三和四可按照 40:25:615:40 比例配成混合液 (一枪加 720 $\mu$ L 该混合液) (该

混合液用多少配多少，现配现用)。

⑤ 依次在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中加入：

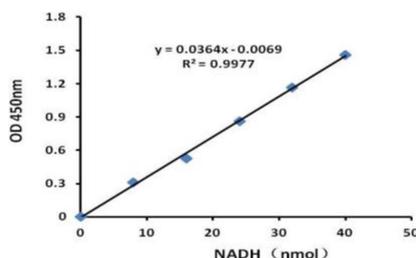
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	80	80 (煮沸的样本)
试剂一	40	40
试剂二	25	25
试剂三	615	615
试剂四	40	40

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  $\Delta A$  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，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  $\Delta A$ 。



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。

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

$$= 11.45 \times (\Delta A + 0.0069) \div \text{Cpr}$$

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。

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

$$= 11.45 \times (\Delta A + 0.0069) \div W$$

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。

$$\text{ALDH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0069) \div 0.0364] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.023 \times (\Delta A + 0.0069)$$

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。

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

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 (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 80μL 各标准品浓度+25μL 试剂二+695μL 试剂三，混匀后孵育 5min 后于 450nm 处读数，根据结果即可制作标准曲线。