

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

（货号：ADS-W-FM014 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 2.1mL 蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 2mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂三	液体 45mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 1mL×1 支	4℃避光保存	1. 临用前取两支新的 EP 管，向新 EP 管中先加 1.1mL 蒸馏水； 2. 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）； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉体 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

- 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、检测步骤：

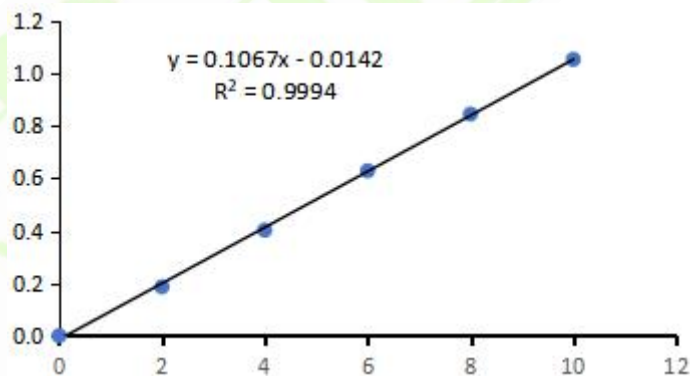
- ① 酶标仪预热 30 min 以上，调节波长到 450nm。所有试剂解冻至室温（25℃）。
- ② 制备对照管样本：取出同一个样本的部分上清液至一新 EP 管中，于 95℃水浴中煮沸 10min 后取出，冷却至室温后于 12000rpm，4℃或者室温离心 10min，取离心后的上清液作为该样本的对照管样本备用。
- ③ 依次在 96 孔板中加入：

试剂组分 (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： $y = 0.1067x - 0.0142$ ；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。

$$\text{ALDH 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0142) \div 0.1067] \div (\text{Cpr} \times V1 \div V) \div T$$

$$= 15.6 \times (\Delta A + 0.0142) \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{ALDH 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0142) \div 0.1067] \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 15.6 \times (\Delta A + 0.0142) \div W$$

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。

$$\text{ALDH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0142) \div 0.1067] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.031 \times (\Delta A + 0.0142)$$

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。

$$\text{ALDH 酶活}(\text{nmol/min/mL})=[(\Delta A+0.0142)\div 0.1067]\div V1\div T=15.6\times(\Delta A+0.0142)$$

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 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℃保存), 标准品母液浓度为 1nmol/μL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. nmol/μL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下:

吸取标准品母液 500uL, 加入 500uL 蒸馏水, 混匀得到 0.5nmol/μL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 nmol/μL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	20	
蒸馏水		20
试剂二	10	10
试剂三	170	170
混匀后孵育 5min 后于 450nm 处读值, $\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。		