

使用说明书

Instruction Manual

乙醛脱氢酶(ALDH)活性检测试剂盒 (微量法)

Acetaldehyde Dehydrogenase Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

乙醛脱氢酶 (Acetaldehyde Dehydrogenase, 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。在人类和许多动物体内, 线粒体乙醛脱氢酶能把对生物体有害的醇类转化, 所以在细胞解毒研究中乙醛脱氢酶受到高度关注; 同时, 乙醛脱氢酶在分子生物学以及相关疾病的检测方面有较广泛的研究应用。

检测原理

在辅酶 I 存在的条件下, 乙醛脱氢酶催化乙醛和 NAD⁺ 转化为乙酸和 NADH, 在 340nm 处的吸光值会增加, 测定 340nm 处的吸光值变化, 可计算得到乙醛脱氢酶的活性。

产品组成及储存条件

100T/96S 规格的产品组成如下:

组成	规格	储存条件
CB0006M-ES	100mL ×1 瓶	4°C保存
CB0006M-A	6mL ×1 瓶	4°C保存
CB0006M-B	2mL ×1 瓶	4°C避光保存
CB0006M-C	1mL ×1 瓶	4°C避光保存
CB0006M-D	1mL ×1 瓶	4°C保存
CB0006M-E	1mL ×1 瓶	4°C保存

操作说明

一、自备用品:

天平、离心机、紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅/恒温培养箱、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

二、ALDH 提取:

- 组织: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5-10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL CB0006M-ES) 进行冰浴匀浆, 然后 10000g, 4°C, 离心 20min, 取上清置于冰上待测。
- 细胞: 按照细胞数量 (10⁴ 个): 提取液体积 (mL) 为 500-1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL CB0006M-ES), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 然后 10000g, 4°C, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。
- 液体: 直接检测或适当稀释后再进行检测。

三、测定步骤:

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长至 340nm, 紫外分光光度计蒸馏水调零。
2. 将 CB0006M-A 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其他物种) 预热 15min。
3. 在微量石英比色皿/96 孔板中依次加入下列试剂:

试剂名称	空白管 (μL)	测定管 (μL)
上清		40
CB0006M-A	60	60
CB0006M-B	20	20
CB0006M-C	10	10
CB0006M-D	10	10
CB0006M-E	10	10
蒸馏水	90	50

充分混匀, 并开始计时, 测定 1min 时 340nm 处吸光值 A1 空白和 A1 测定, 然后迅速置于 37°C 水浴 1min, 于 340nm 处测定吸光值 A2 空白和 A2 测定, 计算 $\Delta A_{\text{对照}} = A2_{\text{对照}} - A1_{\text{对照}}$, $\Delta A_{\text{测定}} = A2_{\text{测定}} - A1_{\text{测定}}$, $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ 。

注: 空白管只需做 1-2 次。

四、ALDH 酶活计算:

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按蛋白浓度计算

酶活定义: 每毫克蛋白每分钟催化还原 1nmol NAD⁺ 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{ALDH 酶活 (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}}}{(V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T} = 804 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按样本质量计算

酶活定义: 每克样品每分钟催化还原 1nmol NAD⁺ 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{ALDH 酶活 (U/g)} = \frac{\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}}}{(V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T} = 804 \times \Delta A \div W$$

3. 按照细胞数量计算

酶活定义: 每 10⁴ 个细胞每分钟催化还原 1nmol NAD⁺ 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{ALDH 酶活 (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}}}{[V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量(万个)}] \div T} = 804 \times \Delta A \div \text{细胞数量(万个)}$$

4. 按液体体积计算

酶活定义: 每毫升蛋白每分钟催化还原 1nmol NAD⁺ 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{ALDH 酶活 (U/mL)} = \frac{\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}} \div T} = 804 \times \Delta A$$

注: ϵ : NADH 微摩尔消光系数, 6.22×10³ L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应体系总体积, 0.2mL; V 样: 反应体系中样本体积, 0.04mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 1min; 10⁹: 单位换算系数, 1mol=10⁹nmol。

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 按样本蛋白浓度计算

酶活定义: 每毫克蛋白每分钟催化还原 1 nmol NAD⁺ 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{ALDH 酶活 (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}}}{(V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T} = 1608 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按样本质量计算

酶活定义: 每克样品每分钟催化还原 1 nmol NAD⁺ 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{ALDH 酶活 (U/g)} = \frac{\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}}}{(V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T} = 1608 \times \Delta A \div W$$

3. 按照细胞数量计算

酶活定义: 每 10⁴ 个细胞每分钟催化还原 1 nmol NAD⁺ 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{ALDH 酶活 (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A}{\epsilon \times d} \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div [V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量(万个)}] \div T$$
$$= 53.59 \times \Delta A \div \text{细胞数量(万个)}$$

4. 液体体积计算

酶活定义：每毫升蛋白每分钟催化还原 1 nmol NAD⁺ 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{ALDH 酶活 (U/mL)} = \frac{\Delta A}{\epsilon \times d} \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 1608 \times \Delta A$$

注： ϵ ：NADH 微摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm； d ：96 孔板光径，0.5cm； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.2mL； $V_{\text{样}}$ ：反应体系中样本体积，0.04mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； C_{pr} ：样本蛋白浓度，mg/mL； W ：样本质量，g； T ：反应时间，1min； 10^9 ：单位换算系数， $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。

注意事项

1. 当样品 ΔA 大于 1 时，建议将样本用提取液稀释后再进行测定；当 ΔA 小于 0.01 时，可以延长反应时间来测定，并注意计算时同步更改计算公式。
2. 蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
3. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

