

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

微量法100T/96S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义

乙醛脱氢酶 (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。

测定原理

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。

自备实验用品及仪器

天平、离心机、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板、蒸馏水。

试剂组成和配制

提取液：液体100mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：液体6mL×1瓶，4℃保存。

试剂二：液体2mL×1瓶，4℃避光保存。

试剂三：液体1mL×1支，4℃避光保存。

试剂四：液体1mL×1支，4℃保存。

试剂五：液体1mL×1支，4℃保存。

ALDH提取

1. 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提取液）进行冰浴匀浆，然后10000g，4℃，离心20min。
2. 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提取液），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℃，离心10min，取上清置于冰上待测。
3. 液体：直接检测。

测定操作表

1. 分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长至340nm。
2. 操作表

	对照管	测定管
样本 (μL)		40
试剂一 (μL)	60	60
试剂二 (μL)	20	20

试剂三 (μL)	10	10
试剂四 (μL)	10	10
试剂五 (μL)	10	10
H ₂ O (μL)	90	50
充分混匀, 37°C, 微量石英比色皿/96孔板, 对照管调零, 于340nm处测定0s与60s的吸光值A1和A2, ΔA= A2-A1。		

ALDH酶活计算

a. 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。

$$\text{ALDH酶活 (nmol/min/mg prot)} = \boxed{} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 804 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\text{ALDH酶活 (nmol/min/g 鲜重)} = \boxed{} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 804 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{ALDH酶活 (nmol/min/104cell)} = \boxed{} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量 (万个)}) \div T = 804 \times \Delta A \div \text{细胞数量 (万个)}$$

(4) 按液体体积计算

酶活定义: 每mL样本每分钟催化还原1nmol NAD⁺的酶量为1个酶活单位。

$$\text{ALDH酶活 (nmol/min/mL)} = \boxed{} \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 804 \times \Delta A$$

□: NADH微摩尔消光系数, $6.22 \times 10^{-3} \text{ L}/\mu\text{mol}/\text{cm}$; 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; C_{pr}: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g

b. 用96孔板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。

$$\text{ALDH酶活 (nmol/min/mg prot)} = \boxed{} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\text{ALDH酶活 (nmol/min/g 鲜重)} = \boxed{} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W + V_{\text{样总}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div W$$

(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1nmol NAD⁺的酶量为1个酶活单位。

$$\text{ALDH酶活 (nmol/min/10}^4\text{cell)} = \boxed{} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} + V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量 (万个)}) \div T = 1608 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

酶活定义：每mL样本每分钟催化还原1nmol NAD⁺的酶量为1个酶活单位。

$$\text{ALDH酶活 (nmol/min/mL)} = \boxed{} \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 1608 \times \Delta A$$

ϵ : NADH微摩尔消光系数, 6.22×10^{-3} L/ $\mu\text{mol/cm}$; d: 96孔板光径, 0.5cm; 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