

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、酶标仪、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 25mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂二: 液体 2mL×1 瓶, 4℃ 避光保存。

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、酶标仪预热 30min, 调节波长至 340nm。
- 2、临用前按样本数量, 将试剂一: 试剂二=200μL:10μL 的比例混合, 充分混匀, 配制成工作液, 用多少配多少。
- 3、操作表

在 96 孔板加入如下试剂

	测定管
样本 (μL)	20
工作液 (μL)	180
充分混匀, 37℃, 于 340nm 处测定初始吸光值与 5min 的吸光值 A1 和 A2, ΔA=A2-A1。	

ALDH 酶活计算

(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。

$$\begin{aligned} \text{ALDH 酶活 (nmol/min/mg prot)} &= \frac{\Delta A}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 643 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned}\text{ALDH 酶活 (nmol/min/g 鲜重)} &= \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 643 \times \Delta A \div W\end{aligned}$$

(3) 按照细胞数量计算

酶活定义：每 10^4 个细胞每分钟催化还原 1nmol NAD^+ 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{ALDH 酶活 (nmol/min/10}^4\text{cell)} &= \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量}) \div T \\ &= 643 \times \Delta A \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

(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。

$$\text{ALDH 酶活 (nmol/min/mL)} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 643 \times \Delta A$$

ε : NADH 微摩尔消光系数, 6.22×10^{-3} L/ $\mu\text{mol}/\text{cm}$; 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, 0.02mL; $V_{\text{样总}}$: 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, 5min。