

## 乙醛脱氢酶（ALDH）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

**注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。**

**货号：**AC10200

**规格：**50T/48S

**产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂二	粉剂×2 瓶	-20℃ 保存
试剂三	液体 1.2mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂四	液体 2 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂五	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃ 保存

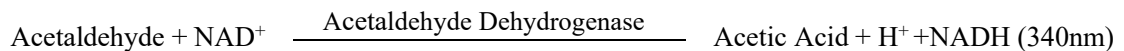
溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前取一瓶试剂二加入 3 mL 蒸馏水溶解，用不完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 2、试剂四：为有毒试剂，实验室注意防护；
- 3、工作液：临用前根据样本数量按照试剂一：试剂二：试剂三：试剂四=300μL：100μL：20μL：30μL（1T）的比例配制工作液，现用现配。

### 产品说明：

乙醛脱氢酶（acetaldehyde dehydrogenase, ALDH）是醛脱氢酶的一种，能够催化乙醛、正丁醛、肉桂醛、苯甲醛等有毒醛类快速脱氢，催化醛类物质氧化生成羧酸，清除有害醛类并减少脂类的过氧化反应，被认为是生物体内活性氧物质的解毒剂。乙醛脱氢酶不仅能够转化代谢对生物体有害的醛类，还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。

乙醛脱氢酶催化乙醛和NAD<sup>+</sup>转化为乙酸和NADH，利用NADH在340nm处吸光值的变化即可计算得到乙醛脱氢酶的活性。



**注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

### 需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、台式离心机、分析天平、水浴锅/恒温培养箱、1mL石英比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

### 操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织样本：按照组织质量 (g)：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例加入提取液（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）进行冰浴匀浆，于 4℃，10000g 离心 20min，取上清置于冰上待测。
2. 细胞/细菌样本：按照细胞/细菌数量 (10<sup>4</sup> 个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例加入提取液（建议 500 万细胞/细菌加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎（功率 300W，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；于 4℃，10000g 离心 20min，取上清置于冰上待测。
3. 血清（浆）等液体：直接检测。若液体有浑浊则离心后进行测定。

## 二、测定步骤

- 1、紫外分光光度计预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。
- 2、工作液37℃预热10min。
- 3、操作表：

试剂名称 (μL)	空白管	测定管
样本	-	200
蒸馏水	200	-
工作液	450	450
试剂五	350	350

在 1mL 石英比色皿中分别加入上述试剂，充分混匀后于 340nm 处测定 1min 时的吸光值 A1，迅速置于 37℃ 水浴 30min，拿出迅速擦干测定 31min 时的吸光值 A2，计算 ΔA 测定=A2 测定-A1 测定，ΔA 空白=A2 空白-A1 空白，ΔA=ΔA 测定-ΔA 空白。空白管只需做 1-2 次

## 三、ALDH酶活计算

### 1. 按蛋白浓度计算

酶活定义：每毫克蛋白每分钟生成1nmol的NADH定义为1个酶活单位。

$$\text{ALDH酶活 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 26.795 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

### 2. 按样本质量计算

酶活定义：每克样本每分钟生成1nmol的NADH定义为1个酶活单位。

$$\text{ALDH酶活 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 26.795 \times \Delta A \div W$$

### 3. 按细胞/细菌数量计算

酶活定义：每10<sup>6</sup>个细胞/细菌每分钟生成1nmol的NADH定义为1个酶活单位。

$$\text{ALDH酶活 (U/10}^6 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times N) \div T = 26.795 \times \Delta A \div N$$

### 4. 按液体体积计算

酶活定义：每mL样本每分钟生成1nmol的NADH定义为1个酶活单位。

$$\text{ALDH酶活 (U/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 26.795 \times \Delta A$$

ε：NADH摩尔消光系数，6.22×10<sup>3</sup> L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V反总：反应体系总体积，0.001L；V样：反应体系中加入样本上清体积，0.2mL；V样总：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL，需自行测定；W：样本质量，g；N：细胞/细菌总数，以10<sup>6</sup>计；T：反应时间：30min；10<sup>9</sup>：单位换算系数，1mol=10<sup>9</sup>nmol。

## 注意事项：

- 1、空白管为检测各试剂组分质量的检测孔，正常情况下，其 OD 值不超过 0.3，变化不超过 0.01。

2、样本  $\Delta A$  大于 1，建议将样本用提取液稀释后再进行测定。当  $\Delta A$  小于 0.01 时，可以延长反应时间（60min 或更长时间）来测定。计算时注意同步更改计算公式。

#### 实验实例：

1、取 0.1084g 水稻叶片，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆研磨，离心取上清稀释 2 倍，之后按照测定步骤操作，用 1mL 石英比色皿测得计算  $\Delta A$  测定= $A_2$  测定- $A_1$  测= $0.844-0.758=0.086$ ， $\Delta A$  空白= $A_2$  空白- $A_1$  空白= $0.094-0.092=0.002$ ， $\Delta A = \Delta A$  测定- $\Delta A$  空白= $0.086-0.002=0.084$ ，按样本质量计算酶活得：

ALDH 酶活 (U/g 质量) =  $26.795 \times 0.084 \div 0.1084 \times 2 = 41.527$  U/g 质量。

2、取 0.1023g 兔肝脏，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆研磨，离心取上清稀释 2 倍，之后按照测定步骤操作，用 1mL 石英比色皿测得计算  $\Delta A$  测定= $A_2$  测定- $A_1$  测= $0.875-0.491=0.384$ ， $\Delta A$  空白= $A_2$  空白- $A_1$  空白= $0.094-0.092=0.002$ ， $\Delta A = \Delta A$  测定- $\Delta A$  空白= $0.384-0.002=0.382$ ，按样本质量计算酶活得：

ALDH 酶活 (U/g 质量) =  $26.795 \times 0.382 \div 0.1023 \times 2 = 200.111$  U/g 质量。

#### 相关发表文献：

[1] Tongmeng Jiang, Jinmin Zhao, Shan Yu, et al. Untangling the response of bone tumor cells and bone forming cells to matrix stiffness and adhesion ligand density by means of hydrogels. *Biomaterials*. January 2019;188:130-143.(IF5.452)

[2] Chong Li, Shi Gao, Xiaotong Li, et al. Efficient metabolic evolution of engineered *Yarrowia lipolytica* for succinic acid production using a glucose-based medium in an in situ fibrous bioreactor under low-pH condition. *Biotechnology for Biofuels*. August 2018;(IF5.452)

[3] Yufei He, Xiaoyan Ci, Ying Xi, et al. Untangling the response of bone tumor cells and bone forming cells to matrix stiffness and adhesion ligand density by means of hydrogels. *Biomaterials*. September 2018;(2019)188:130-143.(IF8.806)

#### 相关系列产品：

AC10172/AC10173 游离脂肪酸 (FFA) 含量检测试剂盒

AC10428/AC10429 脂肪酶 (LPS) 活性检测试剂盒

AC10238/AC10239 乙醇脱氢酶 (ADH) 活性检测试剂盒