

## 线粒体乙醛脱氢酶（ALDH2）活性检测试剂盒（微量法）

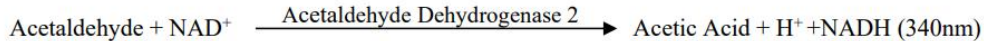
产品货号：BA2236

产品规格：100T/96S

### 产品简介：

线粒体乙醛脱氢酶（aldehyde dehydrogenase 2, ALDH2）属于乙醛脱氢酶蛋白家族，存在于很多组织，特别是肝脏组织内含量较高。该酶主要参与乙醇代谢过程的第二步，在线粒体内将乙醛氧化成羧酸，然后进入三羧酸循环，被彻底分解，解除乙醛对生物体的毒害作用。另外，ALDH2也可作为酯酶参与硝酸甘油的代谢途径，是硝酸甘油重要的生物活性剂。

ALDH2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ALDH2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。

### 产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体110mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体15mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×2支	-20℃
试剂三	液体0.5mL×1支	2-8℃
试剂四	液体1mL×1支	2-8℃
试剂五	液体2.8mL×1瓶	2-8℃

溶液的配制：

1. 试剂二：临用前取一支试剂二加入1.5mL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. 试剂五：沸点低，在使用时保持低温以保证正确的吸取量。用后及时封口。
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：试剂五=110μL：20μL：4μL：6μL：20μL（160μL，1T）的比例配制工作液，现用现配。

### 需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、分析天平、水浴锅/恒温培养箱、微量石英比色皿/96孔UV板、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. 称取约0.1g组织或收集500万细胞，加入1mL提取液，在冰上用匀浆器或研钵进行快速匀浆（匀浆器可上下研磨30次左右）。
2. 4℃ 600g离心10min（如需获得纯度更高的线粒体，可将此步离心速度改为1000g）。
3. 将上清液移至另一离心管中，4℃ 11000g离心15min，弃上清，留沉淀。
4. 在沉淀中加入400μL提取液，超声波破碎（功率200W，超声5秒，间隔10秒，重复15次），用于ALDH2活性测定，若用蛋白浓度计算，取20μL用于蛋白含量测定。

#### 二、测定步骤

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，紫外分光光度计蒸馏水调零。
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	-	40



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

蒸馏水	40	-
工作液	160	160

在微量石英比色皿/96孔UV板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℃水浴或培养箱30min（酶标仪有控温功能可将温度调至37℃），拿出迅速擦干测定31min时的吸光值A2，计算 $\Delta A$ 测定= $A_2$ 测定- $A_1$ 测定， $\Delta A$ 空白= $A_2$ 空白- $A_1$ 空白， $\Delta A = \Delta A$ 测定- $\Delta A$ 空白。空白管只需做1-2次。

### 三、ALDH2 酶活计算

#### A 按微量石英比色皿计算：

##### 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。

$$\text{ALDH2 活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times F = 26.795 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \times F$$

##### 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。

$$\text{ALDH2 活性 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \times F = 10.718 \times \Delta A \div W \times F$$

##### 3. 按细胞数量计算

酶活定义：每 $10^6$ 个细胞每分钟生成1nmol的NADH定义为1个酶活单位。

$$\text{ALDH2 活性 (U/10}^6 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times N) \div T \times F = 10.718 \times \Delta A \div N \times F$$

$\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  L/mol/cm;  $d$ : 比色皿光径, 1cm;  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4}$ L;  $V_{\text{样}}$ : 反应体系中加入样本上清体积, 0.04mL;  $V_{\text{样总}}$ : 线粒体沉淀中加入提取液体积, 0.4mL;  $C_{\text{pr}}$ : 样本蛋白浓度, mg/mL, 需自行测定;  $W$ : 样本质量, g;  $N$ : 细胞总数, 以 $10^6$ 计;  $T$ : 反应时间, 30min;  $10^9$ : 单位换算系数,  $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ ;  $F$ : 稀释倍数。

#### B 按96孔UV板计算：

将上述公式中的  $d=1\text{cm}$  改为  $d=0.6\text{cm}$  (96孔UV板光径) 进行计算即可。

#### 注意事项：

1. 试剂四有毒性，实验过程中，请佩戴好防护用具。
2. 由于提取液中含有一定浓度的蛋白（约1mg/mL），所以在测定样本蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白含量（单独测量）。
3. 样本 $\Delta A$ 大于1时，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）来测定。计算时注意同步更改计算公式。

#### 实验实例：

1. 取0.1067g小鼠肝脏进行样本处理，用提取液稀释4倍后，按照测定步骤操作，用96孔UV板测得计算 $\Delta A$ 测定= $A_2$ 测定- $A_1$ 测定= $0.743-0.169=0.574$ ， $\Delta A$ 空白= $A_2$ 空白- $A_1$ 空白= $0.102-0.102=0$ ， $\Delta A = \Delta A$ 测定- $\Delta A$ 空白= $0.574-0=0.574$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{ALDH2 活性(Ug 质量)} = 0.574 \div (6.22 \times 10^3 \times 0.6) \times 10^9 \times 2 \times 10^{-4} \div (0.04 \times 0.1067 \div 0.4) \div 30 \times 4 = 384.388 \text{ U/g 质量。}$$

2. 取0.1069g冬枣果肉进行样本处理，按照测定步骤操作，用96孔UV板测得计算 $\Delta A$ 测定= $A_2$ 测定- $A_1$ 测定= $0.177-0.119=0.058$ ， $\Delta A$ 空白= $A_2$ 空白- $A_1$ 空白= $0.102-0.102=0$ ， $\Delta A = \Delta A$ 测定- $\Delta A$ 空白= $0.058-0=0.058$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{ALDH2 活性(Ug 质量)} = 0.058 \div (6.22 \times 10^3 \times 0.6) \times 10^9 \times 2 \times 10^{-4} \div (0.04 \times 0.1069 \div 0.4) \div 30 = 9.692 \text{ U/g 质量。}$$

3. 取 $8 \times 10^6$ 个细胞进行样本处理，按照测定步骤操作，用96孔UV板测得计算 $\Delta A$ 测定= $A_2$ 测定- $A_1$ 测定= $0.160-0.109=0.051$ ， $\Delta A$ 空白= $A_2$ 空白- $A_1$ 空白= $0.102-0.102=0$ ， $\Delta A = \Delta A$ 测定- $\Delta A$ 空白= $0.051-0=0.051$ ，按细胞数量计算酶活得：

$$\text{ALDH2 活性(U/10}^6 \text{ cell)} = 0.051 \div (6.22 \times 10^3 \times 0.6) \times 10^9 \times 2 \times 10^{-4} \div (0.04 \times 8 \div 0.4) \div 30 = 0.114 \text{ U/10}^6 \text{ cell。}$$



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com