

线粒体乙醛脱氢酶 (ALDH2) 活性检测试剂盒 (微量法)

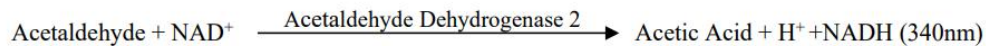
产品货号: BA2236

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⁺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°C
试剂一	液体15mL×1瓶	2-8°C
试剂二	粉剂×2支	-20°C
试剂三	液体0.5mL×1支	2-8°C
试剂四	液体1mL×1支	2-8°C
试剂五	液体2.8mL×1瓶	2-8°C

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°C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°C 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°C 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



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

活性测定，若用蛋白浓度计算，取 20 μ L 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 $^{\circ}$ C 预热 10min。
3. 操作表：

试剂名称 (μ L)	空白管	测定管
样本	-	40
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 $^{\circ}$ C 水浴或培养箱 30min（酶标仪有控温功能可将温度调至 37 $^{\circ}$ C），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， $\Delta A = \Delta A$ 测定 - ΔA 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。

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

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 10⁶ 个细胞每分钟生成 1nmol 的 NADH 定义为 1 个酶活单位。

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

ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22 $\times 10^3$ L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应体系总体积, 2 $\times 10^{-4}$ L;

V 样: 反应体系中加入样本上清体积, 0.04mL; V 样总: 线粒体沉淀中加入提取液体积, 0.4mL; Cpr: 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 10⁶ 计; T: 反应时间, 30min; 10⁹: 单位换算系数, 1mol=10⁹nmol; F: 稀释倍数。

B 按 96 孔 UV 板计算：

将上述公式中的 d=1cm 改为 d=0.6cm (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 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（60min 或更长）来测定。计算时注意同步更改计算公式。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com