

## 线粒体乙醛脱氢酶（ALDH2）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC5515

规格：100T/96S

**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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。**

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

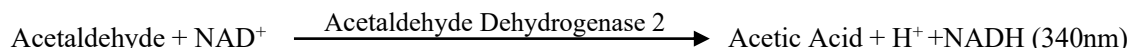
溶液的配制：

- 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。

**产品说明：**

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。

**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）。

- 4°C 600 g 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)。
- 将上清液移至另一离心管中, 4°C 11000 g 离心 15min, 弃上清, 留沉淀。
- 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

- 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。
- 工作液37°C预热10min。
- 操作表:

试剂名称 (μL)	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°C 水浴或培养箱 30min (酶标仪有控温功能可将温度调至 37°C), 拿出迅速擦干测定 31min 时的吸光值 A2, 计算  $\Delta A_{\text{测定}} = A2_{\text{测定}} - A1_{\text{测定}}$ ,  $\Delta A_{\text{空白}} = A2_{\text{空白}} - A1_{\text{空白}}$ ,  $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ 。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:

- 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。

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

- 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。

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

- 按细胞数量计算

酶活定义: 每10<sup>6</sup>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,  $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ;  $d$ : 比色皿光径, 1cm;  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ;  $V_{\text{样}}$ : 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<sup>6</sup>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:

- 试剂四有毒性, 实验过程中, 请佩戴好防护用具。
- 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)。
- 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=A2 测定-A1 测定=0.743-0.169=0.574,  $\Delta A$  空白=A2 空白-A1 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:

ALDH2 活性 (U/g 质量) =  $0.574 \div (6.22 \times 10^3 \times 0.6) \times 10^9 \times 2 \times 10^{-4} \div (0.04 \times 0.1067 \div 0.4) \div 30 \times 4 = 384.388$  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=A2 测定-A1 测定=0.177-0.119=0.058,  $\Delta A$  空白=A2 空白-A1 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:

ALDH2 活性 (U/g 质量) =  $0.058 \div (6.22 \times 10^3 \times 0.6) \times 10^9 \times 2 \times 10^{-4} \div (0.04 \times 0.1069 \div 0.4) \div 30 = 9.692$  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=A2 测定-A1 测定=0.160-0.109=0.051,  $\Delta A$  空白=A2 空白-A1 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:

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

### 参考文献:

[1] Feng Liu, Xiangqin Cui, Harry Horner, et al. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male fertility in maize. *The Plant Cell*. May 2001, 13:1063-1078

[2] Ying Hu, Jinbin Yin, Mingzhi Zheng, et al. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity protects against lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction in rats. *Molecular Medicine Reports*. February 2015, 11:1509-1515

[3] Amit Joshi, Lauren Wassenhove, Kelsey Logas, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 activity and aldehydic load contribute to neuroinflammation and Alzheimer's disease related pathology. *Acta Neuropathologica Communications*. December 2019, 7:190

### 相关系列产品:

- BC0590/BC0595 游离脂肪酸 (FFA) 含量检测试剂盒
- BC0750/BC0755 乙醛脱氢酶 (ALDH) 活性检测试剂盒
- BC1080/BC1085 乙醇脱氢酶 (ADH) 活性检测试剂盒
- BC2340/BC2345 脂肪酶 (LPS) 活性检测试剂盒
- BC5100/BC5105 乙醇含量检测试剂盒
- BC5430/BC5435 羟甲基戊二酰辅酶 A 合成酶 (HMGCS) 活性检测试剂盒