

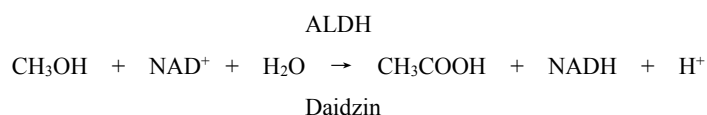
细胞乙醛脱氢酶 2 活性比色法定量检测试剂盒产品说明书

主要用途

细胞乙醛脱氢酶 2 活性比色法定量检测试剂盒是一种旨在使用乙醛脱氢酶 2 敏感性抑制剂，通过检测反应系统中氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD）还原后峰值的增高，即采用比色法来测定细胞裂解萃取液样品中酶活性的权威而经典的技术方法。该技术由大师级科学家精心研制、成功实验证明的。其适用于各种细胞包括胚胎干细胞、神经干细胞等裂解悬液样品（动物、人体等）乙醛脱氢酶 2 的特异活性检测。产品严格无菌，即到即用，操作简捷，性能稳定。

技术背景

乙醛脱氢酶（aldehyde dehydrogenase; ALDH; EC1.2.1.3），又称为乙醛NAD氧化还原酶（aldehyde NAD-oxidoreductase）是一类NAD（P）依赖性酶，催化广谱的外源性或内源性脂肪族和芳香族乙醛类底物氧化，包括乙醇、氨基酸、生物胺（biogenic amine）、维生素、固醇类、脂质、药物和环境分子等代谢产物。乙醛脱氢酶是乙醇在体内分解代谢过程中两种主要酶之一。乙醛脱氢酶把乙醛中的两个氢原子脱掉，使乙醛转化为乙酸，生成的乙酸进入脂肪酸氧化途径，最终被氧化成二氧化碳和水。乙醛脱氢酶主要有两种同工酶：ALDH₁和ALDH₂。ALDH₁存在于胞液中，ALDH₂存在于线粒体中，ALDH₂比ALDH₁的活性高。乙醛脱氢酶的缺少，使酒精不能被完全分解为水和二氧化碳，而是以乙醛继续留在体内，使人喝酒后产生恶心欲吐、昏迷不适等醉酒症状。基于来自于乙醇代谢产生的乙醛（acetaldehyde），在7-羟基-3-（4-羟苯基）-异黄酮-7-糖苷（Daidzein-7-O-β-D-glucopyranoside; Daidzin）存在与否的情况下，由乙醛脱氢酶2的催化作用，转化为乙酸（acetic acid）产物后，通过测定反应体系中氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（oxidized reduced nicotinamide adenine dinucleotide; NAD）转化为还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（reduced nicotinamide adenine dinucleotide; NADH）的变化（340nm 波长），来定量分析乙醛脱氢酶2的特异活性。乙醛脱氢酶2反应系统为：



产品内容

清理液（Reagent A）	毫升
裂解液（Reagent B）	毫升
缓冲液（Reagent C）	毫升
反应液（Reagent D）	毫升
底物液（Reagent E）	毫升
阴性液（Reagent F）	毫升
专性液（Reagent G）	微升
产品说明书	1 份

保存方式

保存缓冲液（Reagent C）、反应液（Reagent D）、底物液（Reagent E）和专性液（Reagent G）在-20℃冰箱里；其余的保存在4℃冰箱里；反应液（Reagent D）和底物液（Reagent E）避免光照；有效保证6月

用户自备

- 1.5 毫升离心管：用于样品保存的容器
- 15 毫升锥形离心管：用于样品制备的容器
- 细胞刮脱棒：用于脱离贴壁细胞
- （微型）台式离心机：用于样品制备
- 比色皿或酶标板：用于比色的容器
- 分光光度仪或酶标仪：用于比色分析

实验步骤

实验开始前，将-20℃冰箱里的试剂盒中的**裂解液（Reagent B）**置入冰槽里预冷。然后进行下列操作。

一、样品准备

1. 准备好 25cm² 细胞培养瓶或 60mm 细胞培养皿的待测培养细胞（1 至 5 X 10⁶ 细胞）
2. 小心加入 xx 毫升**清理液（Reagent A）**，覆盖生长表面
3. 小心抽去清理液
4. 使用细胞刮脱棒轻柔刮脱细胞（注意：*可以使用胰酶消化*）
5. 加入 xx 毫升**清理液（Reagent A）**，混匀细胞
6. 移到到预冷的 15 毫升锥形离心管（注意：*悬浮细胞从这一步骤开始*）
7. 放进 4℃ 台式离心机离心 5 分钟，速度为 300g
8. 小心抽去上清液
9. 加入 xx 微升**裂解液（Reagent B）**，充分混匀
10. 转移到预冷的 1.5 毫升离心管
11. 强力涡旋震荡 15 秒
12. 置于冰槽里孵育 30 分钟
13. 放进 4℃ 微型台式离心机离心 5 分钟，速度为 16000g（或 13000RPM，例如 eppendorf 5415）
14. 小心移取 500 微升上清液到新的预冷的 1.5 毫升离心管
15. 移取 10 微升进行蛋白定量检测（注意：*建议使用 Bradford 蛋白质浓度定量试剂盒—30030.1*）
1. 即刻放进-70℃保存或置于冰槽里继续后续操作

二、测定准备

1. 开启并设定好分光光度仪（温度为 25℃）：波长 340nm，间隔 60 秒，读数 5 次（共 5 分钟），并置零
2. 从-20℃冰箱里取出试剂，置于冰槽里融化；**底物液（Reagent E）**避免光照；**缓冲液（Reagent C）**置于室温下均衡温度

三、背景对照测定

1. 移取 xx 微升**缓冲液 (Reagent C)** 到新的比色皿
2. 加入 xx 微升**反应液 (Reagent D)**
3. 加入 xx 微升**底物液 (Reagent E)**
4. 在 25℃ 温度下孵育 3 分钟
5. 加入 xx 微升**阴性液 (Reagent F)**
6. 上下倾倒数次，混匀（限定在 3 秒之内）
7. 即刻放进分光光度仪检测，此为背景空对照（5 分钟读数－0 分钟读数）

四、样品总活性测定

1. 移取 xx 微升**缓冲液 (Reagent C)** 到新的比色皿
2. 加入 xx 微升**反应液 (Reagent D)**
3. 加入 xx 微升**底物液 (Reagent E)**
4. 在 25℃ 温度下孵育 3 分钟
5. 加入 20 微升待测样品（或 50 微克蛋白）（注意：样品须清澈）
6. 上下倾倒数次，混匀（限定在 3 秒之内）
7. 即刻放进分光光度仪检测，此为样品读数（5 分钟读数－0 分钟读数）

五、样品非特异活性测定

1. 移取 xx 微升**缓冲液 (Reagent C)** 到新的比色皿
2. 加入 xx 微升**专性液 (Reagent G)**
3. 加入 20 微升待测样品（或 50 微克蛋白）（注意：样品须清澈）
4. 上下倾倒数次，混匀
5. 在 25℃ 温度下孵育 10 分钟
6. 加入 xx 微升**缓冲液 (Reagent C)**
7. 加入 xx 微升**反应液 (Reagent D)**
8. 加入 xx 微升**底物液 (Reagent E)**
9. 上下倾倒数次，混匀（限定在 3 秒之内）
10. 即刻放进分光光度仪检测，此为样品读数（5 分钟读数－0 分钟读数）

六、计算样品活性

1) 样品活性（总活性或非特异活性）

【(样品读数－背景读数) X 1 (体系容量，毫升) X 样品稀释倍数】 ÷ 【0.02 (样品容量，毫升) X 6.22 (毫摩尔吸光系数 X 5 (反应时间，分钟))] = 单位/毫升 ÷ (样品蛋白浓度) 毫克/毫升 = 单位/毫克

单位 = 微摩尔 NAD/分钟

2) 样品特异活性

样品总活性测定－样品非特异活性测定 = 样品特异活性

七、酶标板测定

1. 背景对照和样品总活性

1. 在 96 孔酶标板上做好相应标记：背景对照、样品总活性
2. 分别移取 xx 微升缓冲液（Reagent C）到 96 孔板中
3. 分别加入 xx 微升反应液（Reagent D）
4. 分别加入 xx 微升底物液（Reagent E）
5. 在 25℃ 温度下孵育 3 分钟
6. 分别加入 xx 微升阴性液（Reagent F）或待测样品（或 10 微克蛋白）到相应孔中（注意：样品须清澈）
7. 轻轻摇动酶标板
8. 即刻放进酶标仪检测：0 分钟读数和 5 分钟读数

2. 样品非特异活性

1. 在 96 孔酶标板上做好相应标记：样品非特异活性
2. 移取 xx 微升缓冲液（Reagent C）到 96 孔板中
3. 加入 xx 微升专性液（Reagent G）
4. 加入 5 微升待测样品（或 10 微克蛋白）（注意：样品须清澈）
5. 轻轻摇动 96 孔酶标板
6. 在 25℃ 温度下孵育 10 分钟
7. 加入 xx 微升缓冲液（Reagent C）
8. 加入 xx 微升反应液（Reagent D）
9. 加入 xx 微升底物液（Reagent E）
10. 轻轻摇动酶标板
11. 即刻放进酶标仪检测：0 分钟读数和 5 分钟读数

3. 计算样品活性

1) 样品活性（总活性或非特异活性）

$$[(\text{样品读数} - \text{背景读数}) \times \text{样品稀释倍数} \times 0.25 (\text{毫升, 测定容量})] \div [0.005 (\text{样品容量, 毫升}) \times 6.22 (\text{毫摩尔吸光系数}) \times 0.6 (\text{厘米}) \times 5 (\text{分钟})] = \text{单位/毫升} \div (\text{样品蛋白浓度}) \text{毫克/毫升} = \text{单位/毫克}$$

单位 = 微摩尔 NAD/分钟

2) 样品特异活性

样品总活性测定 - 样品非特异活性测定 = 样品特异活性

注意事项

1. 本产品为 20 次（比色皿；10 个样本）和 80 次（酶标板；40 个样本）操作，包括背景对照
2. 操作时，须戴手套

3. 系统操作过程中，背景测定只需 1 次
4. 建议使用比色皿测定
5. 样品须澄清，至关重要
6. 加样后 3 秒内比色测定
7. 测定值由低到高变化；测定可持续 5 分钟
8. 比色测定后，比色皿须清洗彻底
9. 样本测定 5 分钟读数高于 0 分钟读数表明具有酶活性
10. 建议待测样本蛋白浓度为 50 微克/20 微升（本公司提供 Bradford 蛋白质浓度定量试剂盒—30030.1）
11. 如果待测样品浓度过高或过低，可以调整样品浓度
12. 乙醛脱氢酶 2 单位活性定义为：在 25℃，pH 8.0 条件下，每分钟内能够转化 1 微摩尔氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD）为还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NADH）所需的酶量作为一个活性单位
13. 本公司提供系列乙醇代谢酶类检测试剂产品

质量标准

1. 本产品经鉴定性能稳定
2. 本产品经鉴定检测敏感