

乙醛脱氢酶含量试剂盒

微板法

本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断

使 用 说 明 书

货号：JL-T1289

有效期：6个月

规格：48T(24S)/96T(48S)

保存温度：2-8℃和-20℃

实验原理：

酒精代谢的主要途径是乙醇脱氢酶(ADH)氧化成乙醛，然后是 NADH 依赖的乙醛脱氢酶(ALDH)氧化成乙酸。本试剂盒检测原理是底物在乙醛脱氢酶的作用下，将 NAD⁺转化为 NADH，NADH 在电子耦合剂的作用下使 WST-8 显橙黄色，通过测定 450 nm 下吸光值变化可测得乙醛脱氢酶活性。本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法(货号:JL-T0336)。

检测范围：0.067-65.267U/L 灵敏度：0.067U/L

注意事项：

1. 不能使用过期产品，不同货号 and 批号组分不得混用。
2. 本试剂开封后请尽快使用，以免空气、采样污染引起试剂变质。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 如果可能传播疾病，所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。
5. 试剂严格按保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。试剂盒中如有提供粉剂，使用前请甩几下，使粉剂落入底部。

产品组成:

试剂名称	规格 (48T/24S)	规格 (96T/48S)	保存条件
试剂一	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃, 避光
试剂二	1.2mL×1 瓶	1.2mL×2 瓶	2-8℃, 避光
试剂三	25mL×1 瓶	25mL×1 瓶	2-8℃
试剂四	1mL×1 瓶	1mL×1 瓶	2-8℃, 避光
标准品	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃, 避光

所需仪器耗材及试剂:

离心机、酶标仪、可调式移液器、蒸馏水、0.9%生理盐水。

样本处理及要求:

1. **试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围**, 建议实验前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定, 根据预实验的结果, 结合本试剂盒的线性范围: 0.067-65.267U/L, 如果样品中待测物浓度过高或过低, 请对样本做适当的稀释或浓缩, 样本的稀释液为 0.9%生理盐水。
2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中, 建议做预实验验证其检测有效性。

3. **组织样本**：按照组织质量(g):0.9%生理盐水体积(mL)为 1:5~10 的比例（建议取约 0.1g 组织，加入 1mL 0.9%生理盐水）进行匀浆，匀浆后，4°C，10000 g 离心 10min，取上清置冰上待测。如需检测蛋白浓度，可留取部分上清用于蛋白浓度测定。
4. **血清（浆）等液体样本**：澄清液体直接测定，若浑浊则离心后取上清液检测。

检测前准备工作:

1. 请提前取出试剂盒，平衡至室温。
2. 试剂一：临用前取一瓶试剂一加入 1mL 蒸馏水，混合均匀，现配现用。
3. 试剂四：临用前取一支新的 EP 管，向其中先加 950 μ L 蒸馏水，再迅速吸取 50 μ L 的试剂四至蒸馏水中，混匀备用。(该试剂极易挥发，所以吸取操作时动作需迅速)。
4. 工作液的配制：如样本量多，可配制工作液混合加入。临用前按试剂一:试剂二:试剂三:试剂四=10:20:150:10 体积比例配制。(一枪加 190 μ L 该混合液)(该混合液用多少配多少，现配现用)。
5. **标准品溶液的配制**：取一瓶标准品加入 10mL 蒸馏水混合均匀为 1000 μ mol/L 标准品。标准品溶液按下表加入对应量的蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品工作液：0 μ mol/L、100 μ mol/L、200 μ mol/L、300 μ mol/L、400 μ mol/L、500 μ mol/L、600 μ mol/L、800 μ mol/L。(注：配制目标浓度的标准品工作液时，每次请根据表格从标准品母液中取对应的体积与相应稀释液混合均匀后使用。)

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度 (μ mol/L)	0	100	200	300	400	500	600	800
1000 μ mol/L 标准品(μ L)	0	100	200	300	400	500	600	800
蒸馏水(μ L)	1000	900	800	700	600	500	400	200

也可根据实际样本来调整标准品浓度。按照标准孔加样体系操作，依据结果即可制作标准曲线；本说明书中的标曲是用蒸馏水稀释得出，若选取其他稀释液可选择重做标曲。

操作步骤:

1. 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 450nm。
2. 样本测定 (在 96 孔板中依次加入) :

试剂名称(μL)	标准管	测定管
不同浓度标准品	20	
待测样本		20
试剂一		10
试剂二	20	20
试剂三	170	150
试剂四		10

混匀, 30s 时 450nm 下读取各管 A_1 值, 避光反应 30min 后读取各管 A_2 值。 $\Delta A = (A_2 - A_1)$, 标准曲线以标准孔 A_2 值进行拟合。

实验结果结算：

1. **标准品拟合曲线：** $y=ax+b$ 。

2. **组织样本中 ALDH 活力计算公式：**

定义：37°C 条件下，每克组织蛋白每分钟水解乙醛的过程还原 NAD^+ 生成 1 μmol NADH 所需要的 ALDH 酶量为一个活力单位。

ALDH 活性(U/gprot) = $(\Delta A - b) \div a \div T \div \text{Cpr} \times N$

3. **血清(浆)样本中 ALDH 活力计算公式：**

定义：37°C 条件下，每升血清(浆)每分钟水解乙醛的过程还原 NAD^+ 生成 1 μmol NADH 所需要的 ALDH 酶量为一个活力单位。

ALDH 活性(U/L) = $(\Delta A - b) \div a \div T \times N$

注：

ΔA ：测定孔变化 OD 值， $\Delta A = (A_2 - A_1)$ x ：标准品的浓度

T ：孵育反应时间，30min

Cpr ：组织样本蛋白浓度：mg/mL

a ：标曲的斜率

b ：标曲的截距

N ：样本加入检测体系前的稀释倍数

y ：标准孔 OD 值-空白孔 OD 值(标准品浓度为 0 时 OD 值；标准曲线 OD 值

只取 A_2 ，不需要测定 A_1)

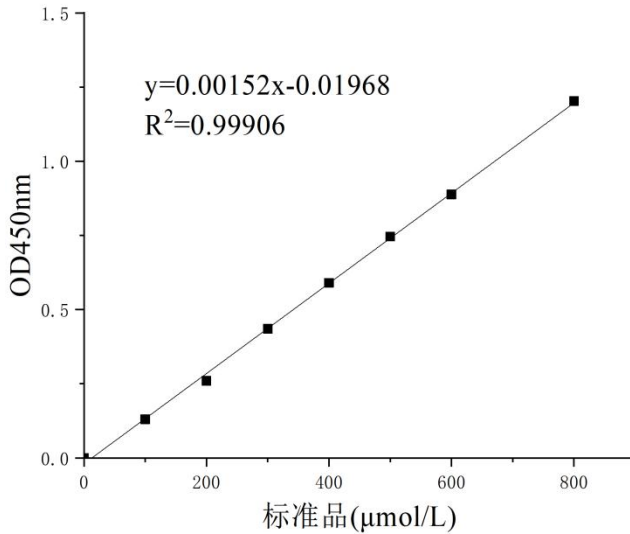
参考样本数据：

以下数据仅供参考：

样本类型	稀释倍数	参考值
大鼠肝脏 (10%匀浆)	5 倍稀释	0.414U/gprot
小鼠肾脏 (10%匀浆)	5 倍稀释	0.594U/gprot
大鼠肺 (10%匀浆)	5 倍稀释	0.760U/gprot
人血清	5 倍稀释	4.801U/L

参考曲线:

$y=0.00152x-0.01968$, $R^2=0.99906$, x 是标准品浓度($\mu\text{mol/L}$), y 是 ΔA 。



注意：本图仅供参考，应以每次实验数据所绘制标准曲线计算样本含量。

Note:

咨询电话：400-0066-400

传 真：021-55660885

电子邮箱：shjls@163.com

网 址：www.jonln.com