

甲酸脱氢酶(FDH)活性测定试剂盒

分光法 48 样

产品简介:

甲酸脱氢酶(FDH, EC 1.2.1.2)属于 D-2-羧基酸脱氢酶类, 广泛应用于辅酶 NADH 的再生中。本试剂盒利用甲酸脱氢酶(FDH)催化甲酸和 NAD⁺不可逆反应生成二氧化碳和 NADH, 通过检测 NADH 在 340nm 的生成速率, 进而计算出甲脱氢酶(FDH)活性大小。

试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 mg×2 支	4°C保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部, 每支再加 0.6mL 蒸馏水溶解。
试剂二	粉剂 mg×2 支	4°C保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部, 每支再加 0.6mL 蒸馏水溶解。
试剂三	液体 35mL×1 瓶	4°C保存	

所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

甲酸脱氢酶(FDH)活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 细菌/培养细胞:

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量 (10^4 个)：建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm, 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

[注]：若增加样本量，可按照数量 (10^4 个)：提取液体积为 500~1000：1 的比例进行提取。

② 液体样本：

直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

② 试剂解冻至室温 (25℃) 或于 25℃水浴中孵育 10min；

③ 在 1mL 石英比色皿 (光径 1cm) 中按照下表依次加入试剂：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	60
试剂一	20
试剂二	20
试剂三	620
混匀，立即于 340nm 处读取 A1，35℃条件下孵育 10min 后读取 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

[注]：1. 若 ΔA 过小如小于 0.01，可增加样本体积 V1 (如增至 120μL，则试剂三相应减少)，或延长反应时间 T (如：30min) 或增加样本质量 W (如增加为 0.2g)，重新调整后 V1 和 T 和 W 需代入公式重新计算。

2. 若 ΔA 值大于 0.5 且 A2 值大于 1.8，需减少样本体积 V1 (如减至 30μL，则试剂

三相应增加), 或缩短反应时间 T (如: 2min 或更短), 重新调整后的样本体积 V1 和反应

时间 T 需代入计算公式重新计算。

结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟生成 1nmol NADH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{FDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 193 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 每一万个细菌/细胞每分钟生成 1 nmol NADH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{FDH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 193 \times \Delta A \div 500$$

3、按液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体样本每分钟生成 1nmol NADH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{FDH 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 193 \times \Delta A$$

V1---加入样本体积, 0.06mL; V---加入提取液体积, 1mL;

V2---反应体系总体积, 7.2×10^{-4} L; d---光径, 1cm;

500---细菌或细胞总数, 万; W---样本质量, g;

ϵ ---NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; T---反应时间, 10min;

Cpr---蛋白质浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。