

微生物及液体样本中甲醛脱氢酶（FDH）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

货号：BC4990

规格：50T/48S

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 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 35mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂三	粉剂×2 支	2-8℃保存
试剂四	液体 3mL×1 瓶	2-8℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前取 1 支加入 0.25 mL 蒸馏水，震荡溶解；用不完的试剂-20℃分装保存 2 周。
- 2、试剂二工作液：根据试验所需用量，按照试剂二（ μL ）：蒸馏水（ μL ）=1:29 比例配成工作液，现配现用。
试剂二工作液当天配制当天用完。
- 3、试剂三：临用前取 1 支加入 1.5 mL 蒸馏水，震荡使其充分溶解。用不完的试剂 2-8℃分装保存 2 周。

产品说明：

甲醛脱氢酶存在于绝大多数原核生物以及所有的真核生物中，是一种将甲醛进行转换的氧化还原酶。甲醛脱氢酶催化甲醛和 NAD^+ 产生 NADH ，在 340nm 处的吸光值会增加，测定 340nm 处的吸光值变化，可计算得到甲醛脱氢酶的活性。

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。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、1 mL 石英比色皿、低温离心机、恒温水浴锅/培养箱、可调式移液枪、超声波细胞破碎仪、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）

细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照每500万细菌或细胞加入1 mL提取液，超声波破碎细胞（功率300w，超声3s，间隔9s，总时间 3 min）；然后8000 g，4℃，离心10 min，取上清（若上清不够澄清，建议重复上述离心步骤），置于冰上待测。

血清及液体样本：直接检测，若液体不澄清，可以离心后取上清测定。

二、测定步骤

- 1、紫外分光光度计预热30 min 以上，调节波长至340 nm，蒸馏水调零。
- 2、临用前将试剂一置于 37℃预热 20 min。
- 3、在 1 mL 石英比色皿中依次加入 100 μL 样本、550 μL 试剂一、250 μL 试剂二工作液、50 μL 试剂三、50 μL 试





剂四，立即充分混匀后于 340nm 处测定 20s 时的吸光值 A1，迅速置于 37°C 水浴锅或者培养箱中反应 5min，拿出迅速擦干测定 5min20s 时的吸光值 A2，记录 340nm 下 20s 时吸光值 A1 和 5min 后的吸光值 A2。计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

三、酶活性计算

1、细菌或培养细胞中 FDH 活力的计算

(1) 按细菌或细胞数量计算：

单位的定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟催化 1 nmol NAD^+ 生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{FDH 酶活 (U/} 10^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times N) \div T \times F = \Delta A \times 321.54 \div N \times F$$

(2) 按蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化 1 nmol NAD^+ 生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{FDH 酶活 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times F = 321.54 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \times F$$

2、血清（浆）或液体样本 FDH 活力的计算

(1) 按液体体积计算：

单位的定义：每 mL 液体样本中每分钟催化 1 nmol NAD^+ 生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{FDH 酶活 (U/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \div T \times F = \Delta A \times 321.54 \times F$$

(2) 按蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化生成 1 nmol NAD^+ 生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{FDH 酶活 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times F = 321.54 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \times F$$

ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6220 L/mol/cm; d : 1mL 石英比色皿光径, 1cm; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL;

$V_{\text{反总}}$: 酶促反应总体积, 0.001L; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.1 mL; T : 反应时间, 5 min; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; N : 细胞或细菌总数, 以万计; F : 稀释倍数; 10^9 : 单位换算系数, 1mol=10⁹ nmol。

注意事项：

1、如果测定吸光值 $A > 1.5$ 或 $\Delta A > 0.5$ ，建议稀释样本后再测定，计算公式中乘以稀释倍数；如果测定吸光值较低，建议增加样本量后再进行测定。

2、试剂四有毒性，实验时请佩戴口罩手套等防护措施。

实验实例：

1、取 0.1g 大肠杆菌沉淀加入 1 mL 提取液，超声波破碎细胞（功率 300W，超声 3s，间隔 9s，总时间 3min）；然后 8000 g，4°C，离心 10 min，取上清按照测定步骤操作，使用 1 mL 石英比色皿测得 $\Delta A = A2 - A1 = 0.297 - 0.039 = 0.258$ ，按细菌数量计算酶活得：

$$\text{FDH 酶活 (U/g 质量)} = 321.54 \times \Delta A \div W \times F = 829.57 \text{ U/g}$$

2、取 0.1 mL 牛血清按照测定步骤操作，使用 1 mL 石英比色皿测得 $\Delta A = A2 - A1 = 0.124 - 0.087 = 0.037$ ，按液体体积计算酶活得：

$$\text{FDH 酶活 (U/mL)} = \Delta A \times 321.54 = 11.896 \text{ U/mL}$$

相关系列产品：

BC4970/BC4975 植物组织中甲醛脱氢酶（FDH）活性检测试剂盒

BC4980/BC4985 动物组织中甲醛脱氢酶（FDH）活性检测试剂盒

