

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

微量法

货号：BC4995

规格：100T/96S

产品内容：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 15mL×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 2 mL×1 瓶	2-8℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前去 1 支加入 0.25 mL 蒸馏水，震荡使其充分溶解（1 瓶粉剂溶解后可做 100T，为了延长使用时间，此产品多给 1 瓶粉剂），可分装后-20℃保存 2 周，避免反复冻融。
- 2、试剂二工作液：临用前按试剂二：蒸馏水=1:29 的体积比例稀释试剂二，现用现配。
- 3、试剂三：临用前取 1 支加入 0.6 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/酶标仪、微量石英比色皿/96孔UV板、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。

二、测定步骤

- 1、紫外分光光度计/酶标仪预热30 min以上，调节波长至340 nm，分光光度计蒸馏水调零。
- 2、临用前将试剂一置于 37℃预热 10 min。
- 3、在微量石英比色皿或 96 孔 UV 板中依次加入 20 μL 样本、110 μL 试剂一、50 μL 试剂二工作液、10 μL 试剂三、10 μL 试剂四，充分混匀后于 340nm 处测定 20s 时的吸光值 A_1 ，迅速置于 37℃水浴或培养箱 5min（酶标仪有控温功能可将温度调至 37℃），拿出迅速擦干测定 5min20s 时的吸光值 A_2 。计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。





三、酶活性计算

A、按微量石英比色皿计算

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。

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

(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。

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

(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 : 微量石英比色皿光径, 1 cm ; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL ;
 $V_{\text{反总}}$: 酶促反应总体积, $2 \times 10^{-4}\text{ L}$; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL ; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.02 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, $1\text{ mol}=10^9\text{ nmol}$ 。

B、按 96 孔 UV 板计算

将上述公式中 $d=1\text{ cm}$ 变为 $d=0.6\text{ cm}$ (96 孔 UV 板光径), 代入公式进行计算即可。

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 0.1 g 大肠杆菌沉淀加入 1 mL 提取液, 超声波破碎细胞 (功率 300 W , 超声 3 s , 间隔 9 s , 总时间 3 min); 然后 8000 g , 4°C , 离心 10 min , 取上清按照测定步骤操作, 用微量石英比色皿测得计算 $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.2523 - 0.0396 = 0.2127$, 按细菌数量计算酶活得:
 $\text{FDH酶活 (U/10}^4\text{ cell)} = 321.54 \times \Delta A \div N = 683.9\text{ U/g}$ 。
- 2、取 0.02 mL 牛血清按照测定步骤操作, 用微量石英比色皿测得计算 $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.1101 - 0.0772 = 0.0329$, 按液体体积计算酶活得:
 $\text{FDH酶活 (U/mL)} = 321.54 \times \Delta A = 10.579\text{ U/mL}$ 。

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

