

## 甲醛脱氢酶（Formaldehyde Dehydrogenase, FDH）试剂盒说明书

微量法 100T/96S

**注 意：**正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

### 测定意义：

甲醛是一种能与蛋白质、核酸和脂类产生非特异性反应的活泼化合物，对所有生物都具有很高毒性。甲醛脱氢酶作为含锌中等链醇脱氢酶（ADH）的家庭成员之一，广泛存在于原核和真核生物中，该酶能利用  $NAD^+$  作为辅酶，将有毒的甲醛氧化，是甲醛氧化途径中的关键酶。

### 测定原理：

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。

### 自备实验用品及仪器：

天平、离心机、酶标仪、96 孔板、蒸馏水。

### 试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4°C 保存。

试剂一：液体 15mL×1 瓶，4°C 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，-20°C 保存；临用前加入 6mL 水溶解待用，用不完的试剂分装后-20°C 保存，禁止反复冻融。

试剂三：粉剂×1 支，4°C 保存；临用前加入 1.5mL 水溶解待用。

试剂四：液体 1.5mL×1 支，4°C 避光保存。

### FDH 提取：

1. 组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）进行冰浴匀浆，然后 10000g，4°C，离心 20min。
2. 细胞：按照细胞数量（ $10^4$  个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 10000g，4°C，离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 液体：直接检测。

### 测定操作表：

- 1、酶标仪预热 30min，调节波长至 340nm。
- 2、操作表

在 96 孔板中加入如下试剂

	测定管
样本（ $\mu$ L）	20
试剂一（ $\mu$ L）	110

试剂二 (μL)	50
试剂三 (μL)	10
试剂四 (μL)	10

混匀，于 340nm 下测定初始吸光值 A1 与 5min 后的吸光值 A2， $\Delta A=A2-A1$ 。

若样本数量较多，可将试剂按比例配成工作液使用。

#### FDH 酶活计算：

(1) 按蛋白浓度计算

**酶活定义：**每毫克蛋白每分钟催化还原 1nmol NAD<sup>+</sup>的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{FDH 酶活 (nmol/min/mg prot)} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 643 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

**酶活定义：**每克样品每分钟催化还原 1nmol NAD<sup>+</sup>的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{FDH 酶活 (nmol/min/g 鲜重)} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$$

(3) 按照细胞数量计算

**酶活定义：**每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟催化还原 1nmol NAD<sup>+</sup>的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{FDH 酶活 (nmol/min/10}^4\text{cell)} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量 (万个)}) \div T = 643 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

**酶活定义：**每 mL 样本每分钟催化还原 1nmol NAD<sup>+</sup>的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{FDH 酶活 (nmol/min/mL)} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 643 \times \Delta A$$

$\varepsilon$ ：NADH 微摩尔消光系数， $6.22 \times 10^{-3}$  L/μmol/cm；d：96 孔板光径，0.5cm；V 反总：反应体系总体积，0.2mL；V 样：反应体系中样本体积，0.02mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；T，反应时间，5min；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g