

甲酸脱氢酶(FDH)活性测定试剂盒

(微板法 96 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 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 mg×2 支	4℃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	粉体 mg×2 支	4℃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 20mL×1 瓶	4℃保存	

所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。

② 试剂解冻至室温 (25℃) 或于 25℃水浴中孵育 10min；

③ 在 96 孔板中按照下表依次加入试剂：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	160
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 V_1 (如增至 40 μ L, 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 V_1 和 T 和 W 需代入公式重新计算。

2. 若 ΔA 值大于 0.5 且 A_2 值大于 1.5, 需减少样本体积 V_1 (如减至 5 μ L, 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 V_1 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。

$$FDH(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_2] \div (V_1 \times C_{pr}) \div T = 321.5 \times \Delta A \div C_{pr}$$

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。

$$FDH(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 321.5 \times \Delta A \div 500$$

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。

$$FDH \text{ 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_1 \div T = 321.5 \times \Delta A$$

V_1 ---加入样本体积, 0.02mL; V ---加入提取液体积, 1mL;

V_2 ---反应体系总体积, 2×10^{-4} L; d ---96 孔板光径, 0.5cm;

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;

C_{pr} ---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。