

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

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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。

组成:

产品名称	CE019-50T/48S	Storage
提取液: 液体	60ml	4°C
试剂一: 液体	30ml	4°C
试剂二: 粉剂	1 瓶	-20°C
试剂三: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂四: 液体	3ml	4°C 避光
说明书	一份	

试剂二: 粉剂×1 瓶, -20°C 保存; 临用前加入 15ml 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 瓶, 4°C 保存; 临用前加入 3ml 水溶解待用。

自备仪器和用品:

天平、离心机、分光光度计、1ml 玻璃比色皿、蒸馏水。

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（10⁴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℃，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、分光光度计预热 30min，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

2、操作表

在比色皿中加入如下试剂

	测定管
样本 (μl)	100
试剂一 (μl)	550
试剂二 (μl)	250
试剂三 (μl)	50
试剂四 (μl)	50

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⁺的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{FDH 酶活 (nmol/min/mg prot)} = \frac{\Delta A}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 322 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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⁺的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{FDH 酶活 (nmol/min/g 鲜重)} = \frac{\Delta A}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 322 \times \Delta A \div W$$

(3) 按照细胞数量计算

酶活定义：每 10⁴ 个细胞每分钟催化还原 1nmol NAD⁺的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{FDH 酶活 (nmol/min/10}^4\text{cell)} = \frac{\Delta A}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量 (万个)}) \div T = 322 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

(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⁺的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{FDH 酶活 (nmol/min/ml)} = \frac{\Delta A}{\epsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 322 \times \Delta A$$

ϵ ：NADH 微摩尔消光系数，6.22×10⁻³ L/μmol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 反总：反应体系总体积，1ml；V 样：反应体系中样本体积，0.1ml；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

