

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, 进而计算出甲酸脱氢酶(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°C保存	
试剂一	粉体 mg×2 支	4°C保存	用前用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°C保存	用前用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°C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（10⁴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（10⁴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，

$$\Delta A = A_2 - A_1。$$

[注]: 1. 若ΔA 过小如小于 0.01，可增加样本体积 V₁（如增至 40μL，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 V1 和 T 和 W 需代入公式重新计算。

2. 若 ΔA 值大于 0.5 且 A2 值大于 1.5, 需减少样本体积 V1 (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 V1 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。

$$FDH(nmol/min/mg\ prot)=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 109 \times V2] \div (V1 \times Cpr) \div T=321.5 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

$$FDH(nmol/min/10^4\ cell)=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V1 \div V) \div T=321.5 \times \Delta A \div 500$$

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。

$$FDH\ 酶活(nmol/min/mL)=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 109] \div V1 \div T=321.5 \times \Delta A$$

V1---加入样本体积, 0.02mL; V---加入提取液体积, 1mL;

V2---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;

Cpr---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。