

# 甲酸脱氢酶(Formate dehydrogenase, FDH)试剂盒

分光法 48 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<sup>+</sup>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 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 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	粉剂 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 35mL×1 瓶	4℃保存	

## 所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、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°C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 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

② 试剂解冻至室温（25°C）或于 25°C水浴中孵育 10min；

③ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中按照下表依次加入试剂：

试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	测定管
样本	60
试剂一	20
试剂二	20
试剂三	620

混匀，立即于 340nm 处读取  $A_1$ ，35°C 条件下孵育 10min 后读取  $A_2$ ， $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

**[注]**：1. 若 $\Delta A$  过小如小于 0.01，可增加样本体积  $V_1$ （如增至 120 $\mu\text{L}$ ，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 $\Delta A$  值大于 0.5 且  $A_2$  值大于 1.8, 需减少样本体积  $V_1$  (如减至  $30\mu\text{L}$ , 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  $1\text{nmol NADH}$  的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{FDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_2] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T = 193 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

#### 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  $1\text{nmol NADH}$  的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{FDH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 193 \times \Delta A \div 500$$

#### 3、按液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体样本每分钟生成  $1\text{nmol NADH}$  的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{FDH 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_1 \div T = 193 \times \Delta A$$

$V_1$ ---加入样本体积,  $0.06\text{mL}$ ;  $V$ ---加入提取液体积,  $1\text{mL}$ ;

$V_2$ ---反应体系总体积,  $7.2 \times 10^{-4}\text{L}$ ;  $d$ ---光径,  $1\text{cm}$ ;

500---细菌或细胞总数, 万;  $W$ ---样本质量,  $\text{g}$ ;

$\epsilon$ ---NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3\text{L}/\text{mol}/\text{cm}$ ;  $T$ ---反应时间,  $10\text{min}$ ;

$\text{Cpr}$ ---蛋白质浓度,  $\text{mg}/\text{mL}$ , 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。