

甲酸脱氢酶(Formate dehydrogenase, FDH)试剂盒说明书

(货号: G0445W 微板法 96 样)

一、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。

二、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	粉剂 mg×2 支	4°C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°C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°C保存	

三、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。

四、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 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm。
- ② 试剂解冻至室温 (25°C) 或于 25°C 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°C 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 V1 (如增至 40 μL , 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 μL , 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。

五、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。

$$\text{FDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V2] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 321.5 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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 nmol NADH 的酶量为 1 个酶活单位。

$$\text{FDH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 321.5 \times \Delta A \div 500$$

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。

$$\text{FDH 酶活}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 321.5 \times \Delta A$$

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。