

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

微量法100T/96S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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。

自备实验用品及仪器

天平、离心机、酶标仪、96孔板、蒸馏水。

试剂组成和配制

提取液：液体100mL×1瓶，4°C保存。

试剂一：液体15mL×1瓶，4°C保存。

试剂二：粉剂×1瓶，-20°C保存；临用前加入6mL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支，4°C保存；临用前加入1.5mL水溶解待用。

试剂四：液体1.5mL×1支，4°C避光保存。

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（10<sup>4</sup>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°C，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. 酶标仪预热30min，调节波长至340nm。
2. 操作表

在96孔板中加入如下试剂

	测定管
样本（ $\mu\text{L}$ ）	20
试剂一（ $\mu\text{L}$ ）	110
试剂二（ $\mu\text{L}$ ）	50
试剂三（ $\mu\text{L}$ ）	10

试剂四 (μL)	10
----------	----

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<sup>+</sup>的酶量为1个酶活单位。

$$\text{FDH酶活 (nmol/min/mg prot)} = \boxed{\phantom{000}} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 643 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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<sup>+</sup>的酶量为1个酶活单位。

$$\text{FDH酶活 (nmol/min/g 鲜重)} = \boxed{\phantom{000}} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$$

(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<sup>+</sup>的酶量为1个酶活单位。

$$\text{FDH酶活 (nmol/min/104cell)} = \boxed{\phantom{000}} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量 (万个)}) \div T = 643 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

(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<sup>+</sup>的酶量为1个酶活单位。

$$\text{FDH酶活 (nmol/min/mL)} = \boxed{\phantom{000}} \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 643 \times \Delta A$$

$\square$ : NADH微摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^{-3} \text{ L}/\mu\text{mol}/\text{cm}$ ; d: 96孔板光径, 0.5cm; V反总: 反应体系总体积, 0.2mL; V样: 反应体系中样本体积, 0.02mL; 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