

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

(货号: BP10387W 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

甲酸脱氢酶(FDH, EC 1.2.1.2)属于 D-2-羧基脱氢酶类, 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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 2 支	4℃保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 每支再加 0.6mL 蒸馏水溶解; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉剂 2 支	4℃保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 每支再加 0.6mL 蒸馏水溶解; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

- 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、检测步骤:

- 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:

试剂组分 (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, ΔA = A2-A1。	

- 【注】：1. 若 ΔA 过小如小于 0.01，可增加样本体积 V_1 （如增至 40 μ 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 ΔA 值大于 0.5 且 A_2 值大于 1.5，需减少样本体积 V_1 （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 V_1 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。

$$\text{FDH}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_2] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T = 321.5 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{FDH}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 321.5 \times \Delta A \div 500$$

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。

$$\text{FDH 酶活}(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_1 \div T = 321.5 \times \Delta A$$

V_1 ---加入样本体积，0.02mL；

V ---加入提取液体积，1mL；

V_2 ---反应体系总体积，2 $\times 10^{-4}$ 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 $\times 10^3$ 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。