

甲醛脱氢酶（FDH）检测试剂盒（微量法）

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⁺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⁺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。

试剂组成和配制：

试提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 15mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存；临用前加入 6mL 水溶解待用，用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。

试剂三：粉剂×1 支，4℃ 保存；临用前加入 1.5mL 水溶解待用。

试剂四：液体 1.5mL×1 支，4℃ 避光保存。

FDH 提取：

- 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℃，离心 20min。
- 细胞：**按照细胞数量（10⁴ 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℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。
- 液体：**直接检测。

测定步骤表：

- 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 (μL)	20
试剂一 (μL)	110
试剂二 (μL)	50
试剂三 (μL)	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⁺的酶量为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{FDH 酶活 (nmol/min/mg prot)} &= \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 643 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(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⁺的酶量为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{FDH 酶活 (nmol/min/g 鲜重)} &= \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 643 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(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⁺的酶量为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{FDH 酶活 (nmol/min/10}^4\text{cell)} &= \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量 (万个)}) \div T \\ &= 643 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(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⁺的酶量为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{FDH 酶活 (nmol/min/mL)} &= \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 643 \times \Delta A \end{aligned}$$

ε ：NADH 微摩尔消光系数， 6.22×10^{-3} L/μmol/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