甲醛脱氢酶（FDH）检测试剂盒（分光光度法）

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：

提取液：液体 60mL×1 瓶，4℃保存。

试剂一：液体 30mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃保存；临用前加入 15mL 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 瓶，4℃保存；临用前加入 3mL 水溶解待用。

试剂四：液体 3mL×1 瓶，4℃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℃，离心 20min。
2. **细胞：**按照细胞数量（10^4 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。
3. **液体：**直接检测。

测定操作表：

1、 分光光度计预热 30min，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

2、 操做表

在比色皿中加入如下试剂

	测定管
样本（μL）	100
试剂一（μL）	550
试剂二（μL）	250
试剂三（μL）	50
试剂四（μL）	50

混匀，于 340nm 下测定初始吸光值 A1 与 5min 后的吸光值 A2，△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。

FDH 酶活（nmol/min/mg prot）= $\frac{\Delta A}{\varepsilon \times d}$ ×V 反总÷（V 样×Cpr）÷T

= 322×△A÷Cpr

（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。

FDH 酶活（nmol/min/g 鲜重）= $\frac{\Delta A}{\varepsilon \times d}$ ×V 反总÷（V 样×W÷V 样总）÷T

=322×△A÷W

（3）按照细胞数量计算

酶活定义：每 10^4 个细胞每分钟催化还原 1nmol NAD^+的酶量为 1 个酶活单位。

FDH 酶活（nmol/min/10^4cell）= $\frac{\Delta A}{\varepsilon \times d}$ ×V 反总÷（V 样÷V 样总×细胞数量（万个））÷T

= 322×△A÷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^+的酶量为 1 个酶活单位。

FDH 酶活（nmol/min/mL）= $\frac{\Delta A}{\varepsilon \times d}$ ×V 反总÷V 样÷T

=322×△A

ε：NADH 微摩尔消光系数，6.22×10^{-3} L/μmol/cm；　　d：比色皿光径，1cm；

V 反总：反应体系总体积，1mL；　　V 样：反应体系中样本体积，0.1mL；

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。