

动物组织中甲醛脱氢酶（FDH）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

货号：AC10772

规格：50T/48S

产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 35 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×2 支	-20°C保存
试剂三	粉剂×2 支	4°C保存
试剂四	液体 3 mL×1 瓶	4°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 0.25 mL 蒸馏水，充分混匀；用不完的试剂-20°C分装保存两周，避免反复冻融。
- 2、试剂二工作液：根据试验所需用量，按照试剂二（ μL ）：蒸馏水（ μL ）=1：29 比例配成工作液，现配现用。试剂二工作液当天配制当天用完。
- 3、试剂三：临用前加入 1.5 mL 蒸馏水，充分溶解；用不完的试剂 4°C分装保存两周。

产品说明：

甲醛脱氢酶存在于绝大多数原核生物以及所有的真核生物中，是一种将甲醛进行转换的氧化还原酶。甲醛脱氢酶可催化甲醛和 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。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、低温离心机、恒温培养箱/水浴锅、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：**一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）**

组织：按照动物组织质量（g）：提取液体积（mL）=1：5~10 的比例（建议称取 0.1 g 动物组织，加入 1 mL 提取液），冰浴匀浆，8000 g，4°C条件下离心 10 min；取上清（若上清不够澄清，建议重复上述离心步骤）置于冰上待测。

二、测定步骤

- 1、紫外分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm，蒸馏水调零。
- 2、临用前将试剂一、试剂四置于 37°C预热 10min。

3、在 1 mL 石英比色皿中依次加入 100 μ L 样本、550 μ L 试剂一、250 μ L 试剂二工作液、50 μ L 试剂三、50 μ L 试剂四，立即充分混匀后于 340nm 处测定 20s 时的吸光值 A1，迅速置于 37°C 水浴锅或者培养箱中反应 5min，拿出迅速擦干测定 5min 20s 时的吸光值 A2，记录 340nm 下 20s 时吸光值 A1 和 5min 后的吸光值 A2。计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

三、动物组织中甲醛脱氢酶活性计算

1、按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每mg组织蛋白每分钟催化生成1 nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{FDH酶活 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \times F = 321.54 \times \Delta A \div \text{Cpr} \times F$$

2、按样本质量计算：

单位的定义：每g组织每分钟催化生成1 nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{FDH酶活 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \times F = 321.54 \times \Delta A \div W \times F$$

ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6220 L/mol/cm; d : 比色皿光径, 1 cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.001L; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.1 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL; T : 反应时间, 5 min; Cpr : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; 10^9 : 单位换算系数, 1mol=10⁹ nmol; F : 稀释倍数。

注意事项：

1、如果测定吸光值 $A > 1.0$ 或 $\Delta A > 0.5$ ，建议用提取液稀释样本后再测定，计算公式中乘以稀释倍数；如果测定吸光值较低，建议增加样本量后再进行测定。

2、试剂四有毒性，实验时请佩戴口罩手套等防护用具。

实验实例：

1、称取 0.1 g 小鼠心脏组织，加入 1 mL 提取液，冰浴匀浆，8000 g，4°C 条件下离心 10 min；取上清置于冰上待测。使用 1mL 石英比色皿按照测定步骤操作，计算 $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.626 - 0.301 = 0.325$ ，按公式计算小鼠心脏组织中甲醛脱氢酶活性：

$$\text{FDH酶活 (U/g 质量)} = 321.54 \times \Delta A \div W \times F = 1045 \text{ U/g 质量}$$

2、称取 0.1 g 小鼠肝脏组织，加入 1 mL 提取液，冰浴匀浆，8000 g，4°C 条件下离心 10 min；取上清稀释 10 倍置于冰上待测。使用 1mL 石英比色皿按照测定步骤操作，计算 $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.224 - 0.136 = 0.088$ ，按公式计算小鼠肝脏组织中甲醛脱氢酶活性：

$$\text{FDH酶活 (U/g 质量)} = 321.54 \times \Delta A \div W \times F = 2829.6 \text{ U/g 质量}$$