

β-羟丁酸脱氢酶 (β-HBDH)

rp216193

储存温度

-20℃储存，避免反复冻融。

技术指标

外观	白色无定型冻干粉末
蛋白纯度	≥90%
比活性	≥300 U/mg 酶粉
苹果酸脱氢酶	≤0.002%
ATP 酶	≤0.005%
乳酸脱氢酶	≤0.002%
NADH 氧化酶	≤0.002%

酶学性质

来源	微生物	
分类	EC 1.1.1.30	
分子量	27 kDa (SDS-PAGE)	
等电点	6.1	
Km 值	1.46 × 10 ⁻² M (D-3-Hydroxybutyrate), 9.5 × 10 ⁻⁵ M (NAD ⁺)	
抑制剂	Hg ²⁺ , Ag ⁺ SDS	
最适 pH	8.5	图 1
最适温度	60℃	图 2
pH 稳定性	5.0 - 10.0 (25℃, 16 h)	图 3
热稳定性	50℃以下稳定 (pH 8.5, 30 min)	图 4
稳定性	-25 ~ -15℃静置保存 12 个月保持 90%以上活性	图 5

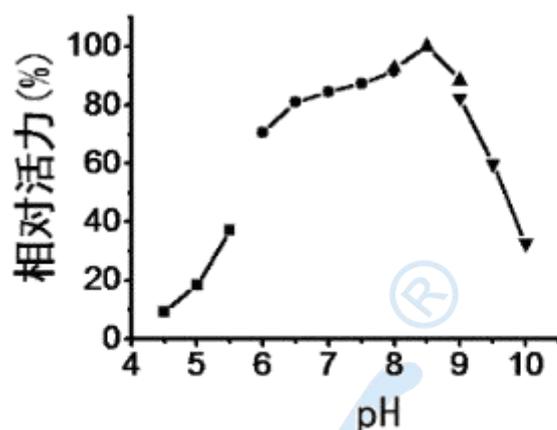


图 1 最适 pH

Buffer solution:pH 4.5-5.5,acetate buffer;pH 6.0-8.0,Na-phosphate;pH 8.0-9.0,Tris-HCl;
pH 9.0-10.0,Glycine-NaOH.Enzyme concentration:1mg/mL

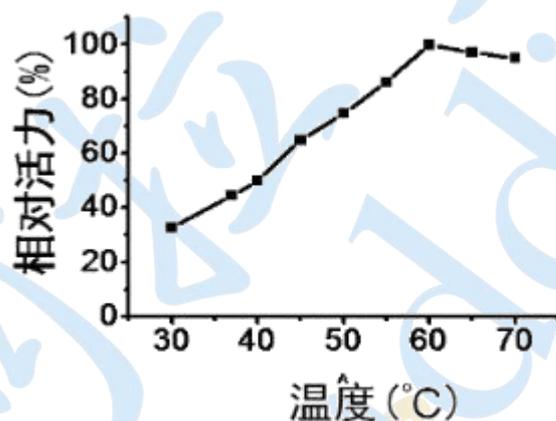


图 2 最适温度

Reaction in 100 mM Tris-HCl buffer pH 8.5. Enzyme concentration: 1mg/mL

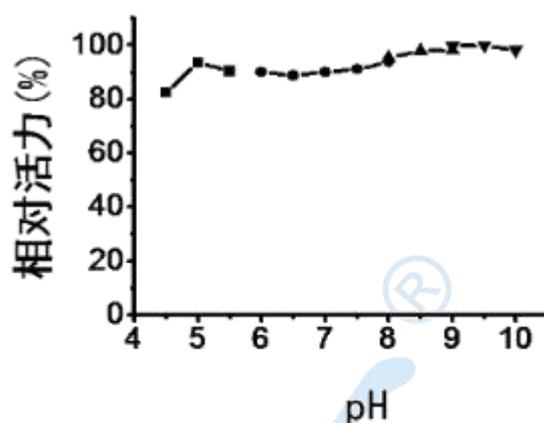


图 3 pH 稳定性

25°C, 16 h-treatment with 50 mM buffer solution: pH 4.5-5.5, acetate buffer;
pH 6.0-8.0, Na-phosphate; pH 8.0-9.0, Tris-HCl; pH 9.0-10.0, Glycine-NaOH.
Enzyme concentration: 1mg/mL

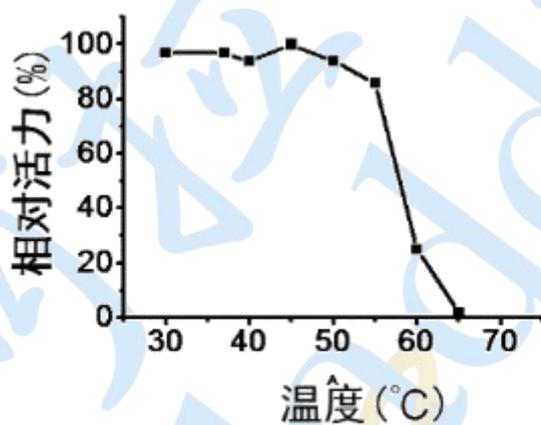


图 4 热稳定性

30 min-treatment with 100 mM Tris-HCl buffer, pH 8.5. Enzyme concentration: 1mg/mL

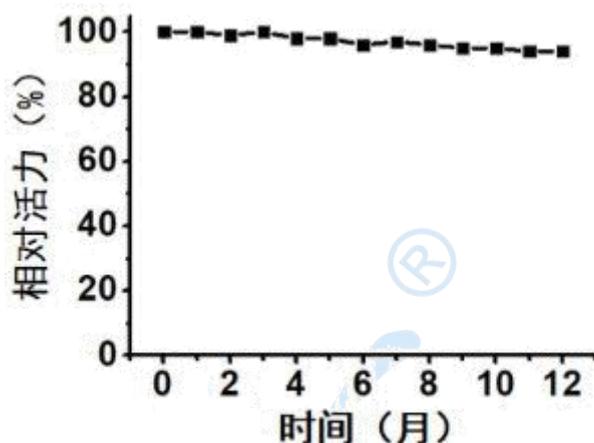


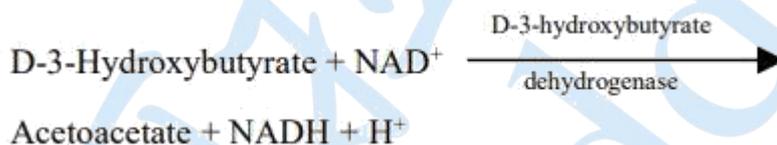
图 5 稳定性 (-25 ~ -15°C保存)

用途

用于β-羟丁酸试剂的研发和大量配制。

活性测定方法

原理



反应生成的 NADH 的量可用分光光度计在 340nm 检测。

酶活定义

单位酶活定义为在下述反应条件下，每分钟生成 1μmol NADH 所需的酶量。

试剂准备

试剂 I: 100 mM pH 8.5 Tris-HCl 缓冲液。

试剂 II: 158 mM 3-羟丁酸钠溶液 (用试剂 I 溶解)。

试剂 III: 27.9 mM NAD⁺ (用试剂 I 溶解)。

试剂 IV: 100 mM Tris-HCl, pH 8.5, 含 0.1% BSA。

待测样品: 用试剂 IV 将酶液稀释至 0.1-0.5 U/mL。

操作步骤

1. 在 3 mL 比色皿中加入 2.3 mL 试剂 I, 0.5 mL 试剂 II, 0.2 mL 试剂 III, 37°C 预热 5 min。
2. 加入 100μL 待测样品, 混匀。
3. 在 340nm 处 37°C 反应, 记录 1 min 内的吸光度变化 (ΔAs)。

*用酶稀释液替代酶液，其它步骤相同，所得 溶液吸光度为空白吸光 (ΔA_b)。

$$\Delta A = \Delta A_s - \Delta A_b$$

活力计算

$$\text{Volume activity (U/ml)} = \frac{\Delta A \times v_t \times d_f}{6.22 \times V_s \times 1.0} = \Delta A \times 4.98 \times d_f$$

$$\text{Weight activity (U/mg)} = \text{Volume activity} \times 1/C$$

Vt: 反应液总体积 (3.1 mL);

Vs: 酶液体积 (0.1 mL);

1.0: 光路长度 (cm);

df: 稀释倍数;

C: 酶浓度 (mg/mL);

6.22: 标准反应条件下，生色基团在 340 nm 处毫摩尔吸光系数 ($\text{cm}^2/\mu\text{mol}$)。