

脱氢酶 (dehydrogenase, DHA) 试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

脱氢酶(dehydrogenase, DHA) 是一类催化物质氧化还原反应的酶, 催化底物通过细胞色素系统被氧化, 释放的能量供机体使用, 是生物体取得能量的一种方式。

测定原理：

在细胞呼吸过程中, 氢受体 2, 3, 5 - 氯化三苯基四氮唑 (2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chloride, TTC) 在脱氢酶作用下接受氢以后, 被还原为三苯基甲蹼 (Triphenyl Formazone, TF), TF 呈现红色, 于 485nm 测定其吸光值, 即得脱氢酶活性。

组成：

产品名称	OT023-100T/96S	Storage
提取液：液体	100ml	4°C
试剂一：粉剂	1 瓶	4°C避光
试剂二：液体	20ml	4°C
试剂三：甲醇	(自备)	--
说明书	一份	

试剂一：粉剂×1 瓶, 使用前加 10ml 试剂二溶解, 4°C避光保存 (尽量现配现用)。

自备仪器和用品：

筛子、天平、恒温培养箱或水浴锅、低温离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、冰、蒸馏水、甲醇 (不允许快递, 请用户自备)。

样品处理：

1、细菌、真菌：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 8000g, 4°C, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

2、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 8000g, 4°C, 离心 20min。

3、液体：直接检测。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



测定步骤:

	空白管	测定管
样品 (μl)		100
蒸馏水 (μl)	100	
试剂一 (μl)		100
试剂二 (μl)	100	

充分混匀, 37°C培养 24h:

试剂三 (μl)	900	900
----------	-----	-----

振荡 1h, 8000g, 25°C, 离心 5min, 取 200μl 上清于微量石英比色皿/96 孔板, 测定 A485, $\Delta A = A$ 测定 - A 空白管。空白管只要做一管。

脱氢酶活力计算:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线: $y = 0.0422x - 0.0312$; $R^2 = 0.9988$; x 为标准品浓度 (μg/ml), y 为吸光值。

1. 按照蛋白浓度计算

酶活单位定义: 在 37°C 时, 每 mg 蛋白样品每 min 催化产生 1μgTF 为一个酶活性单位。

$$DHA (\mu\text{g} / \text{min} / \text{mg prot}) = (\Delta A + 0.0312) \div 0.0422 \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 0.181 \times (\Delta A + 0.0312) \div C_{\text{pr}}$$

2. 按照样本质量计算

酶活单位定义: 在 37°C 时, 每克样品每 min 催化产生 1μgTF 为一个酶活性单位。

$$DHA (\mu\text{g} / \text{min} / \text{g 鲜重}) = (\Delta A + 0.0312) \div 0.0422 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.181 \times (\Delta A + 0.0312) \div W$$

3. 按液体体积计算

酶活单位定义: 在 37°C 时, 每 ml 样本每 min 催化产生 1μgTF 为一个酶活性单位。

$$DHA (\mu\text{g} / \text{min} / \text{ml}) = (\Delta A + 0.0312) \div 0.0422 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 0.181 \times (\Delta A + 0.0312)$$

V 反总: 反应总体积, 1.1ml; V 样: 加入反应体系中样本体积, 0.1ml; T: 培养时间, 1d=1440min;
W: 样品质量, g; Cpr: 蛋白浓度, mg/ml。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线: $y = 0.0211x - 0.0312$; $R^2 = 0.9988$; x 为标准品浓度 (μg/ml), y 为吸光值。

1. 按照蛋白浓度计算

酶活单位定义: 在 37°C 时, 每 mg 蛋白样品每 min 催化产生 1μgTF 为一个酶活性单位。

$$DHA (\mu\text{g} / \text{min} / \text{mg prot}) = (\Delta A + 0.0312) \div 0.0211 \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 0.362 \times (\Delta A + 0.0312) \div C_{\text{pr}}$$

2. 按照样本质量计算

酶活单位定义: 在 37°C 时, 每克样品每 min 催化产生 1μgTF 为一个酶活性单位。

$$DHA (\mu\text{g} / \text{min} / \text{g 鲜重}) = (\Delta A + 0.0312) \div 0.0211 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.362 \times (\Delta A + 0.0312) \div W$$



3. 按液体体积计算

酶活单位定义：在 37°C 时，每 ml 样本每 min 催化产生 1 μ gTF 为一个酶活性单位。

$$\text{DHA } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{ml}) = (\Delta A + 0.0312) \div 0.0211 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 0.362 \times (\Delta A + 0.0312)$$

V 反总：反应总体积，1.1ml；V 样：加入反应体系中样本体积，0.1ml；T：培养时间，1d=1440min；

W：样品质量，g；Cpr：蛋白浓度，mg/ml。

注意事项：

配制好的试剂一避光保存于 4°C，最好在一周内使用，若出现红色，则不能使用。

