

脱氢酶（dehydrogenase, DHA）试剂盒说明书 (分光法 48 样)

一、产品简介：

脱氢酶(DHA) 是一类催化物质氧化还原反应的酶，传统方法是用氯化三苯基四氮唑（TTC）作为脱氢酶的氢受体，但生成的有色物质甲臜是不溶于水以至操作麻烦，且灵敏度低；本试剂盒提供一种简单，灵敏，快速的测定方法，利用改性的氮四唑盐作为氢受体，其生成的橙黄色甲臜物质易溶于水，于 460nm 测定其吸光值，即得脱氢酶活性。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	液体 2ml×1 瓶	4℃保存
试剂二	液体 35mL×1 瓶	4℃保存

三、所需的仪器和用品：

分光光度计、1mL 玻璃比色杯（光径须为 1cm）、天平、恒温培养箱或水浴锅、可调式移液器、低温离心机、冰、蒸馏水。

四、脱氢酶（DHA）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：

称约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min。取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取

②细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液；冰浴超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 300W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次）；12000rpm，4℃离心 10min。取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：澄清的液体样本直接检测；若浑浊则离心后取上清液再测。

2、上机检测：

① 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 460nm，蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入：

试剂名称（ μL ）	测定管	空白管（仅做一次）
样品	80	
蒸馏水		80
试剂一	40	40
试剂二	630	630
充分混匀，37℃恒温培养箱，完全避光培养 3h，全部转移至 1mL 玻璃比色杯中，于 460nm 处读取吸光值， $\Delta A=A$ 测定-A 空白。		

五、结果计算：

1、按照样本质量计算

酶活单位定义：在 37℃时，每克样品每分钟催化产生 1μg 甲贲物质为一个酶活单位。

$$\text{DHA} (\mu\text{g} / \text{min} / \text{g} \text{ 鲜重}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^6 \times \text{Mr}) \div (\text{W} \times V1 \div V) \div T = 1.05 \times \Delta A \div \text{W}$$

2、按照蛋白浓度计算

酶活单位定义：在 37℃时，每 mg 蛋白样品每分钟催化产生 1μg 甲贲物质为一个酶活单位。

$$\text{DHA} (\mu\text{g} / \text{min} / \text{mg prot}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^6 \times \text{Mr}) \div (\text{W} \times V1 \div V) \div T = 1.05 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

3、按液体体积计算

酶活单位定义：在 37℃时，每 mL 样本每 min 催化产生 1 nmol 甲贲物质为一个酶活性单位。

$$\text{DHA} (\mu\text{g} / \text{min} / \text{mL}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^6 \times \text{Mr}) \div V1 \div T = 1.05 \times \Delta A$$

ε----甲贲物质的摩尔消光系数， $3.1 \times 10^4 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$

d----光径，1cm；

V----提取液体积，1mL；

V1----加入反应体系中样本体积，0.08mL；

V2----反应体系总体积， $750\mu\text{L} = 7.5 \times 10^{-4}\text{L}$ ；

T----培养时间，3h=180min；

W----样品质量，g；

Mr----甲贲物质的分子量，624.47；

Cpr----蛋白浓度，mg/mL。建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。