

脱氢酶（dehydrogenase, DHA）试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

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：

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，在波长 485nm 处有最大吸收峰，采用分光光度法于 485nm 测定其吸光值，即得脱氢酶活性。

自备实验仪器及用品：

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）。

试剂的组成和配制：

提取液：液体 50mL×1 瓶，4℃ 保存

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

试剂二：液体 20mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：甲醇，自备。

样品处理：

1. 细菌、真菌：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 8000g，4℃，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℃，离心 20min。
3. 液体：直接检测。

测定步骤和操作表：

	空白管	测定管
样品（ μL ）		150
蒸馏水（ μL ）	150	
试剂一（ μL ）		150
试剂二（ μL ）	150	
充分混匀，37℃ 培养 24h		
试剂三（ μL ）	1350	1350
振荡 1h，8000g，25℃，离心 5min，取 1mL 上清于比色皿，测定 A485， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白管}}$ 。空白管只要做一管。		

脱氢酶活力计算:

标准曲线: $y = 0.0422x - 0.0312$; $R^2 = 0.9988$; x 为标准品浓度 ($\mu\text{g/mL}$), 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 $1 \mu\text{gTF}$ 为一个酶活性单位。

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

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 $1 \mu\text{gTF}$ 为一个酶活性单位。

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

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 $1 \mu\text{gTF}$ 为一个酶活性单位。

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

$V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 1.65mL ; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中样本体积, 0.15mL ; T : 培养时间, $1\text{d}=1440\text{min}$; 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。