脱氢酶（dehydrogenase, DHA）试剂盒说明书

微量法 100 管/96 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，被还原为三苯基甲潽（Triphenyl Formazone, TF），TF 呈现红色，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 100mL×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）		100
蒸馏水（μL）	100	
试剂一（μL）		100
试剂二（μL）	100	
充分混匀，37℃培养 24h		
试剂三（μL）	900	900

振荡 1h，8000g，25℃，离心 5min，取 200μL 上清于微量石英比色皿/96 孔板，测定 A485，△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℃时，每 mg 蛋白样品每 min 催化产生 1μgTF 为一个酶活性单位。

DHA（μg/ min / mg prot）=（△A+0.0312）÷ 0.0422×V 反总÷（Cpr×V 样）÷T= 0.181×（△A+0.0312）÷Cpr

2．按照样本质量计算

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

DHA（μg/ min /g 鲜重）=（△A+0.0312）÷ 0.0422×V 反总÷（W×V 样÷V 样总）÷T= 0.181×（△A+0.0312）÷W

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 1μgTF 为一个酶活性单位。

DHA（μg/ min /mL）=（△A+0.0312）÷ 0.0422×V 反总÷V 样÷T= 0.181×（△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℃时，每 mg 蛋白样品每 min 催化产生 1μgTF 为一个酶活性单位。

DHA（μg/ min / mg prot）=（△A+0.0312）÷ 0.0211×V 反总÷（Cpr×V 样）÷T= 0.362×（△A+0.0312）÷Cpr

2．按照样本质量计算

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

DHA（μg/ min /g 鲜重）=（△A+0.0312）÷ 0.0211×V 反总÷（W×V 样÷V 样总）÷T= 0.362×（△A+0.0312）÷W

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 1μgTF 为一个酶活性单位。

DHA（μg/ min /mL）=（△A+0.0312）÷ 0.0211×V 反总÷V 样÷T= 0.362×（△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℃，最好在一周内使用，若出现红色，则不能使用。