

## 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，被还原为三苯基甲腈（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（ $\mu$ L）		150
蒸馏水（ $\mu$ L）	150	
试剂一（ $\mu$ L）		150
试剂二（ $\mu$ L）	150	
充分混匀，37℃培养 24h		
试剂三（ $\mu$ L）	1350	1350
振荡 1h，8000g，25℃，离心 5min，取 1mL 上清于比色皿，测定 A485， $\Delta A=A$ 测定-A 空白管。空白管只		

**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  $37^\circ\text{C}$  时，每  $\text{mg}$  蛋白样品每  $\text{min}$  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  $37^\circ\text{C}$  时，每克样品每  $\text{min}$  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  $37^\circ\text{C}$  时，每  $\text{mL}$  样本每  $\text{min}$  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， $1.65\text{mL}$ ；  $V_{\text{样}}$ ：加入反应体系中样本体积， $0.15\text{mL}$ ；  $T$ ：培养时间， $1\text{d}=1440\text{min}$ ；  $W$ ：样品质量， $\text{g}$ ；  $\text{Cpr}$ ：蛋白浓度， $\text{mg/mL}$ 。

**注意事项：**

配制好的试剂一避光保存于  $4^\circ\text{C}$ ，最好在一周内使用，若出现红色，则不能使用。