

## 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，被还原为三苯基甲锷（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<sup>4</sup>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（ $\mu\text{L}$ ）		100
蒸馏水（ $\mu\text{L}$ ）	100	
试剂一（ $\mu\text{L}$ ）		100
试剂二（ $\mu\text{L}$ ）	100	
充分混匀，37℃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, ΔA=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。

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

##### 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1μgTF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1μgTF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, 1.1mL;  $V_{\text{样}}$ : 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;  $\text{Cpr}$ : 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。

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

##### 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1μgTF为一个酶活性单位。

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

##### 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1μgTF为一个酶活性单位。

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

$V_{\text{反总}}$ : 反应总体积, 1.1mL;  $V_{\text{样}}$ : 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;  $\text{Cpr}$ : 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。

---

[www.affandi-e.com](http://www.affandi-e.com)