

脱氢酶 (dehydrogenase, DHA) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-QT010-96 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	液体 1ml×1 支	4℃避光保存
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4℃保存

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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, 也可按照细菌/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、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上 (等仪器过自检程序亦可), 调节波长至 460nm。

② 在 96 孔板中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样品	20	
蒸馏水		20
试剂一	10	10
试剂二	170	170
混匀, 37℃恒温培养箱, 完全避光培养 3h, 于 460nm 处读取吸光值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

五、结果计算:

1、按照样本质量计算

酶活单位定义：在 37°C 时，每克样品每分钟催化产生 1 μ g 甲臞物质为一个酶活单位。

$$\text{DHA } (\mu\text{g} / \text{min} / \text{g } \text{鲜重}) = (\Delta A \div \varepsilon \div d \times V2 \times 10^6 \times \text{Mr}) \div (W \times V1 \div V) \div T = 2.24 \times \Delta A \div W$$

2、按照蛋白浓度计算

酶活单位定义：在 37°C 时，每 mg 蛋白样品每分钟催化产生 1 μ g 甲臞物质为一个酶活单位。

$$\text{DHA } (\mu\text{g} / \text{min} / \text{mg } \text{prot}) = (\Delta A \div \varepsilon \div d \times V2 \times 10^6 \times \text{Mr}) \div (W \times V1 \div V) \div T = 2.24 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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 nmol 甲臞物质为一个酶活性单位。

$$\text{DHA } (\mu\text{g} / \text{min} / \text{mL}) = (\Delta A \div \varepsilon \div d \times V2 \times 10^6 \times \text{Mr}) \div V1 \div T = 2.24 \times \Delta A$$

4、按细菌或细胞数量计算：

酶活单位定义：在 37°C 时，每克样品每分钟催化产生 1 μ g 甲臞物质为一个酶活单位。

$$\text{DHA } (\mu\text{g} / \text{min} / 10^4 \text{ cell}) = (\Delta A \div \varepsilon \div d \times V2 \times 10^6 \times \text{Mr}) \div (500 \times V1 \div V) \div T = 2.24 \times \Delta A \div 500$$

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

d ----光径，0.5cm;

V ----提取液体积，1mL;

$V1$ ----加入反应体系中样本体积，0.02mL;

$V2$ ----反应体系总体积， $200\mu\text{L} = 2 \times 10^{-4} \text{L}$;

T ----培养时间，3h=180min;

W ----样品质量，g;

Mr ----甲臞物质的分子量，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。

500----细菌或细胞总数，万。