

脱氢酶（dehydrogenase, DHA）试剂盒说明书

(微板法 96 样)

一、产品简介：

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臌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，其生成的橙黄色甲臌物质易溶于水，于 460nm 测定其吸光值，即得脱氢酶活性。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	液体 1ml×1 瓶	4℃保存
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4℃保存

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、天平、恒温培养箱或水浴锅、可调式移液器、低温离心机

四、脱氢酶（dehydrogenase, DHA）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

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、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 460nm。

② 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（ μ L）	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， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

【注】：若 ΔA 值接近零，可增加样本加样量 V1（如增至 50 μ L 或更多，则试剂二相应减少，保持总体积不变），或延长反应时间 T（如由 3h 增至 6h）。则改变后的 V1 和 T 需重新代入公式计算。

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 μg 甲胍物质为一个酶活单位。

$$\text{DHA}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_2 \times 10^6 \times \text{Mr}) \div (W \times V_1 \div V) \div T = 2.24 \times \Delta A \div W$$

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 μg 甲胍物质为一个酶活单位。

$$\text{DHA}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_2 \times 10^6 \times \text{Mr}) \div (W \times V_1 \div V) \div T = 2.24 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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 甲胍物质为一个酶活性单位。

$$\text{DHA}(\mu\text{g}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_2 \times 10^6 \times \text{Mr}) \div V_1 \div T = 2.24 \times \Delta A$$

ε---甲胍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；

V1---加入反应体系中样本体积，0.02mL；

V---提取液体积，1mL；

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；

Mr---甲胍物质的分子量，624.47；

W---样品质量，g；

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。