

Dehydrogenase (DHA) Activity Assay Kit

脱氢酶 (DHA) 试剂盒说明书

货号: G0123W | 方法: 微板法 | 规格: 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:

试剂名称	规格	保存要求
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 1ml×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4°C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°C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°C离心 10min。取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量(10^4 个): 提取液体积(mL)为 500~1000:1 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 所有试剂解冻至室温 (25°C) 或于水浴锅 (25°C) 中孵育 5-15min。

③ 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°C恒温培养箱, 完全避光培养 3h, 于 460nm 处读取吸光值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

注意: 本操作流程适用于绝大多数常规样本检测, 实验条件可根据实际样本状态适度微调; 针对特殊类型样本, 我司技术支持可提供专属优化建议。

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 甲贍物质为一个酶活单位。

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

2、按照蛋白浓度计算：

酶活单位定义：在 37°C 时，每毫克蛋白样品每分钟催化产生 1 μ g 甲贍物质为一个酶活单位。

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

3、按照细胞数量计算：

酶活单位定义：在 37°C 时，每百万个细胞每分钟催化产生 1 μ g 甲贍物质为一个酶活单位。

$$\text{DHA}(\mu\text{g}/\text{min}/10^6 \text{ cell})=(\Delta A \div \varepsilon \div d \times V_2 \times 10^6 \times \text{Mr}) \div (5 \times V_1 \div V) \div T = 0.45 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

4、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 甲贍物质为一个酶活性单位。

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

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

V_1 ---加入反应体系中样本体积，0.02mL；

V_2 ---反应体系总体积， $200\mu\text{L} = 2 \times 10^{-4}\text{L}$ ；

Mr ---甲贍物质的分子量，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。

d ---光径，0.5cm；

V ---提取液体积，1mL；

T ---培养时间，3h=180min；

W ---样品质量，g；