

使用说明书

Instruction Manual

脱氢酶活性检测试剂盒（微量法）

DHA Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

脱氢酶（dehydrogenase, DH）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。

检测原理

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，被还原为三苯基甲𨾏（Triphenyl Formazone, TF），TF 呈现红色，于 485nm 测定其吸光值，即得脱氢酶活性。

产品组成及储存条件

100T/96S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0067M-ES	100mL×1 瓶	4℃保存。
CB0067M-A	粉剂×1 瓶	使用前加 10mL CB0067M-B 溶解，4℃避光保存（尽量现配现用）。
CB0067M-B	20mL×1 瓶	4℃保存。
CB0067M-C	甲醇	自备，室温保存。

注：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、自备用品：

可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、筛子、天平、恒温培养箱或水浴锅、低温离心机、冰、蒸馏水、甲醇（不允许快递，请用户自备）。

二、粗酶液提取：

- 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 CB0067M-ES），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。
- 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 CB0067M-ES）进行冰浴匀浆，然后 8000g，4℃，离心 20min。
- 液体：直接检测。

三、测定步骤：

- 分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长至 485nm。
- 样本测定：在微量石英比色皿/96 孔板中加入下列试剂：

试剂名称	空白管 (μL)	测定管 (μL)
样品		100
蒸馏水	100	
CB0067M-A		100
CB0067M-B	100	
充分混匀, 37°C培养 24h。		
CB0067M-C	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。		

注: 空白管只需测定一次。

四、脱氢酶活力计算公式:

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 ($\mu\text{g/mL}$), y 为吸光值。

1. 按照蛋白浓度计算

酶活单位定义: 在 37°C 时, 每 mg 蛋白样品每 min 催化产生 1 μgTF 为一个酶活性单位。

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

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 1 μgTF 为一个酶活性单位。

$\text{DHA } (\mu\text{g/min/g 鲜重}) = (\Delta A + 0.0312) \div 0.0422 \times V \text{ 反总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.181 \times (\Delta A + 0.0312) \div W$

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 1 μgTF 为一个酶活性单位。

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

注: V 反总: 反应总体积, 1.1mL; V 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; 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 ($\mu\text{g/mL}$), y 为吸光值。

1. 按蛋白含量计算

酶活单位定义: 在 37°C 时, 每 mg 蛋白样品每 min 催化产生 1 μgTF 为一个酶活性单位。

$\text{DAO 活性} (\text{nmol/min/mg prot}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 228 \times \Delta A \div \text{Cpr}$

2. 按样本质量计算

酶活定义: 37°C, pH7.6 时, 每克样品 1min 内转化 1nmol 底物的酶量为一个酶活单位。

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

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 μgTF 为一个酶活性单位。

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

注: V 反总: 反应总体积, 1.1mL; V 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; Cpr : 蛋白浓度, mg/mL。

注意事项

1. 配制好的试剂避光保存于 4°C, 最好在一周内使用, 若出现红色, 则不能使用。
2. 蛋白定量测定, 建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
3. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
4. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

