

使用说明书

Instruction Manual

脱氢酶活性检测试剂盒（分光光度法）

DHA Assay Kit (Spectrophotometry)

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，被还原为三苯基甲腈（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

50T/48S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0067S-ES	50mL×1 瓶	4℃保存。
CB0067S-A	粉剂×1 瓶	使用前加10mL CB0067S-B溶解，4℃避光保存（尽量现配现用）。
CB0067S-B	20mL×1 瓶	4℃保存。
CB0067S-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、1 mL 玻璃比色皿、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 CB0067S-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 CB0067S-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：在玻璃比色皿中加入下列试剂：

试剂名称	空白管 (μL)	测定管 (μL)
样品		150
蒸馏水	150	
CB0067S-A		150
CB0067S-B	150	
充分混匀, 37°C培养 24h。		
CB0067S-C	1350	1350
振荡 1h, 8000g, 25°C, 离心 5min, 取 1mL 上清于比色皿, 测定 A485, $\Delta A = A - A_{\text{空白管}}$ 。		

注：空白管只需测定一次。

四、脱氢酶活力计算公式：

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。

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

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： $V_{\text{反总}}$ ：反应总体积，1.65mL； $V_{\text{样}}$ ：加入反应体系中样本体积，0.15mL； T ：培养时间，1d=1440min； W ：样品质量，g； C_{pr} ：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。

