



脱氢酶活性检测试剂盒

DHA Assay Kit

微量法

产品编号: AK475M

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES475	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK475-A	粉剂×1 瓶	使用前加10mL AK475-B溶解, 4℃避光保存(尽量现配现用)。
AK475-B	20mL×1 瓶	4℃保存;
AK475-C	甲醇	自备, 室温保存;

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 脱氢酶 (dehydrogenase, DHA) 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。

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。

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)。

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 ES475), 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 ES475) 进行冰浴匀浆, 然后 8000g, 4℃, 离心 20min。
- 液体: 直接检测。

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	
AK475-A		100
AK475-B	100	
充分混匀, 37℃培养 24h		
AK475-C	900	900
振荡 1h, 8000g, 25℃, 离心 5min, 取 200μL 上清于微量石英比色皿/96 孔板, 测定 A485, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白管}}$ 。空白管只要做一管。		

注意: 空白管只需测定一次。

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 $1\mu\text{gTF}$ 为一个酶活性单位。

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

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 $1\mu\text{gTF}$ 为一个酶活性单位。

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

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 $1\mu\text{gTF}$ 为一个酶活性单位。

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

注: $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 1.1mL ; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中样本体积, 0.1mL ; T : 培养时间, $1\text{d}=1440\text{min}$; 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 $1\mu\text{gTF}$ 为一个酶活性单位。

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

2. 按样本质量计算

酶活定义: 37°C , $\text{pH}7.6$ 时, 每克样品 1min 内转化 1nmol 底物的酶量为一个酶活单位。

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

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 $1\mu\text{gTF}$ 为一个酶活性单位。

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

注: $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 1.1mL ; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中样本体积, 0.1mL ; T : 培养时间, $1\text{d}=1440\text{min}$; W : 样品质量, g ; Cpr : 蛋白浓度, mg/mL 。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司: [BCA Protein Assay Kit \(C05-02001\)](#)

注意事项:

1. 配制好的试剂一避光保存于 4°C , 最好在一周内使用, 若出现红色, 则不能使用。