

脱氢酶(DHA)检测试剂盒（动物组织、血清等）

货号：PMK1224

保存：4℃避光保存 12 个月

规格：48T/48S 96T/96S

适用样本：动物组织、细胞、细菌、血清（浆）等液体样本

产品简介

脱氢酶(dehydrogenase, DHA) 是一类催化物质氧化还原反应的酶, 广泛存在于各种生物体中, 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。本试剂盒提供了一种简单、简便的微量法, 用于测定样本中的 DHA。原理是在细胞呼吸过程中, 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, 在 485nm 处有最大吸收峰, 在 485nm 下测定 TF 生成速率, 即可反映 DHA 活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48 T	96 T	
提取液	50mL	100mL	4℃
试剂一	5mL	10mL	4℃
试剂二	粉剂×1 支	粉剂×2 支	4℃, 避光保存
试剂三	自备	自备	室温
标准品	粉剂×1 支	粉剂×2 支	4℃, 避光保存

自备耗材

酶标仪或可见光分光光度计（能测 485nm 处的吸光度）

恒温箱、制冰机、低温离心机

96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头

去离子水、DMSO

匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

提取液：即用型；4℃保存。

试剂一：即用型；整个实验过程中，冰上放置；4℃保存。

试剂二：96T 粉剂×2 支，48T 粉剂×1 支，使用前每支加 1.5mL 试剂一涡旋溶解，4℃避光保存。最好在一周内使用，尽量现配现用，若出现红色，则不能使用。

试剂三：DMSO，自备。

标准品：每支加入 1mL DMSO 得 5mM ($\mu\text{mol/mL}$) 的 TF 标准溶液，该溶液可 4 度保存一周。

标准曲线设置：按下表所示，用 DMSO 将 5 $\mu\text{mol/mL}$ 标准品稀释为 1600、800、400、200、100、50、25 nmol/mL 标准溶液 的标准溶液。

	标准品体积 (μL)	DMSO 体积 (μL)	标准品浓度 (nmol/mL)
标准品 1	64 μL of 5 $\mu\text{mol/mL}$	136	1600

产品说明书

标准品 2	100μL of 标准品 1 (1600nmol/mL)	100	800
标准品 3	100μL of 标准品 2 (800nmol/mL)	100	400
标准品 4	100μL of 标准品 3 (400nmol/mL)	100	200
标准品 5	100μL of 标准品 4 (200nmol/mL)	100	100
标准品 6	100μL of 标准品 5 (100nmol/mL)	100	50
标准品 7	100μL of 标准品 6 (50nmol/mL)	100	25

注意：每次实验，请使用新配制的标准品。

样本制备

动物组织：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 预冷的提取液，冰浴匀浆，8,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

细胞：收集 500 万细胞到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1mL 提取液，冰浴超声波破碎细胞 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 8,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

血清、血浆或其它生物学液体：可直接用来检测，或者如果有必要，建议将样本根据预实验结果用提取液稀释后再进行检测。

注意：建议使用新鲜样本。如果不立即使用，可将样品在-80℃下保存一个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或可见光分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 485nm，可见光分光光度计去离子水调零。
2. 提取液、试剂三和试剂四 37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）预热 10min
3. 操作表（下述操作在 96 孔板或微量玻璃比色皿中操作）：

试剂（μL）	测定管	对照管	标准管	空白管
样品	25	25	0	0
DMSO	0	0	0	25
标准品	0	0	25	0
试剂二	25	0	0	0
试剂一	0	25	25	25

充分混匀，37℃培养 40min

试剂三	225	225	225	225
-----	-----	-----	-----	-----

手动摇晃或短暂涡旋使沉淀溶解，8000g，25℃，离心 5min，取 200 μL 上清在 485nm 波长处测定各孔的吸光值 A。计算相对吸光值 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 、 $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。（空白和标准曲线只需做一次）

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果 $\Delta A_{\text{测}}$ 小于 0.001 可适当加大样本量。如果 ΔA 大于 1.0，样本可用提取液进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。

结果计算

1. 标准曲线的绘制

以 TF 标准溶液浓度为 y 轴， $\Delta A_{\text{标}}$ 为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。将样本的 $\Delta A_{\text{测}}$ 代入方程得到 y 值（nmol/mL）。

2. DHA 活性量的计算

（1）按样本质量计算

产品说明书

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化产生 1nmol TF 为一个酶活性单位 U。

DHA 活性 (U/g 质量) = $(y \times V_{\text{反总}}) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.05y \div W$

(2) 按液体样本体积计算

单位的定义：每 mL 液体样本在反应体系中每分钟产生 1nmol TF 定义为一个酶活性单位 U。

DHA 活性 (U/mL) = $(y \times V_{\text{反总}}) \div V_{\text{样}} \div T = 0.05y$

(3) 按细菌或细胞数量计算

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟产生 1nmol TF 定义为一个酶活力单位 U。

DHA 活性 (U/ 10^4 cell) = $(y \times V_{\text{反总}}) \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.0001 \times y$

(4) 按蛋白浓度计算

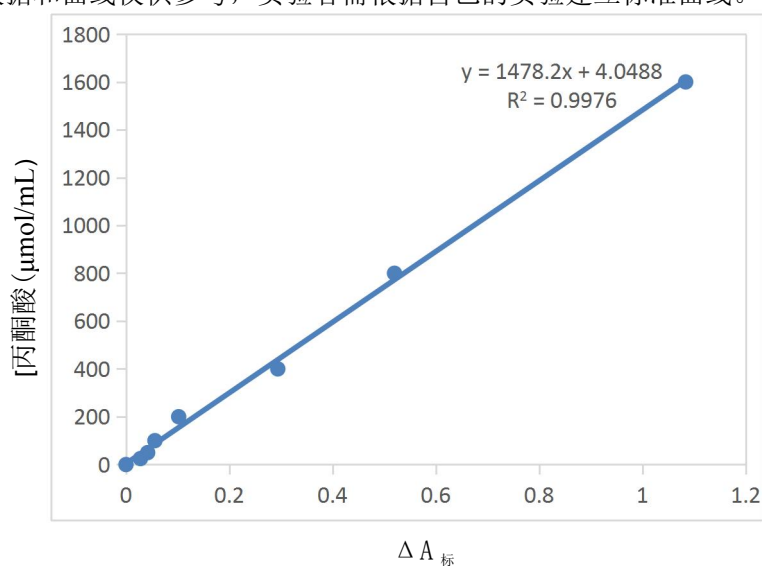
单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟产生 1nmol TF 定义为一个酶活力单位 U。

α -GC 活性 (U/mg prot) = $(y \times V_{\text{反总}}) \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T = 0.05y \div Cpr$

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.05mL；W：样本质量，g； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.025mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，40min；；500：细胞或细菌总数，500 万；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL。

结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1110 丙酮酸脱氢酶 (PDH) 检测试剂盒 (微量法)
PMK1228 莽草酸脱氢酶 (SD) 检测试剂盒 (微量法)
PMK1214 肉桂醇脱氢酶 (CAD) 检测试剂盒 (微量法)
PMK1230 亚铁氧化酶 (HP) 检测试剂盒 (微量法)
PMK1231 高铁还原酶 (FCR) 检测试剂盒 (微量法)

更多产品详情了解，请关注公众号：

