上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co.， Ltd
电话：400-666-5481　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：3008007435@qq.com

脱氢酶(DHA)试剂盒

可见分光光度法

货号：R43830-48S

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攒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， 其生成的橙黄色甲攒物质易溶于水，于460nm 测定其吸光值，即得脱氢酶活性。

试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求
提取液	液体60mL×1瓶	4℃保存
试剂一	液体2ml×1瓶	4℃保存
试剂二	液体35mL×1瓶	4℃保存

所需的仪器和用品：

分光光度计、1mL 玻璃比色杯(光径须为1cm) 、天平、恒温培养箱或水浴锅、可调式移液器、低温离心机、冰、蒸馏水。

脱氢酶 (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℃ 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℃ 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分光光度计预热30min 以上，调节波长至460nm, 蒸馏水调零。

②在EP管中依次加入：

试剂名称(μL)	测定管	空白管(仅做一次)
样品	80	
蒸馏水		80
试剂一	40	40
试剂二	630	630
充分混匀，37℃恒温培养箱，完全避光培养3h,全部转移至1mL玻璃比色杯中，于460nm处读取吸光值，ΔA=A测定-A空白。		

【注】:若ΔA值接近零，可增加样本加样量V1(如增至200μL或更多，则试剂二相应减少，保持总体积不变),或延长反应时间T (如由3h增至6h)。则改变后的V1和T 需重新代入公式计算。

结果计算：

1、按照样本质量计算：

酶活单位定义：在37℃时，每克样品每分钟催化产生1μg甲攒物质为一个酶活单位。

DHA(μg/min/g 鲜重)=(ΔA÷ε÷d×V2×10^6×Mr)÷(W×V1÷V)÷T=1.05×ΔA÷W

2、按照蛋白浓度计算：

酶活单位定义：在37℃时，每mg 蛋白样品每分钟催化产生1 μg甲攒物质为一个酶活单位。

DHA(μg/min/mg　prot)=(ΔA÷ε÷d×V2×10^6×Mr)÷(W×V1÷V)÷T=1.05×ΔA÷Cpr

3、按液体体积计算：

酶活单位定义：在37℃时，每mL 样本每min 催化产生1nmol 甲攒物质为一个酶活性单位。

DHA(μg/min/mL)=(ΔA÷ε÷d×V2×10^6×Mr)÷V1÷T=1.05×ΔA

E---甲攒物质的摩尔消光系数，3.1×10^4L/mol/cm;

d-- 光径，1cm;

V1---加入反应体系中样本体积，0.08mL;

V---提取液体积，1mL;

V2---反应体系总体积，750 μL=7.5×10^{-4}L;

T---培养时间，3h=180min;

Mr--- 甲攒物质的分子量，624.47;

W---样品质量， g;

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。