

脱氢酶 (dehydrogenase, DHA) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义

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。

测定原理

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，被还原为不溶于水的三苯基甲脒 (TTF)，TTF 呈现红色，于 485nm 测定其吸光值，即得脱氢酶活性。

自备实验仪器及用品

天平、恒温培养箱或水浴锅、低温离心机、可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿、冰、蒸馏水、甲醇（不允许快递，请用户自备）。

试剂的组成和配制

试剂一：液体 60mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：粉剂×2 瓶，4℃ 避光保存，临用前每瓶加入 30mL 蒸馏水溶解（现配现用）。

试剂三：液体 25mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂四：甲醇，自备。

样品处理

取新鲜根系样本，洗净后称取 0.1g，放入 10mL 离心管中。

测定步骤和操作表

	空白管	测定管
样品 (g)		0.1
试剂一 (mL)		1
试剂二 (mL)		1
充分混匀，37℃ 避光培养 2h		
试剂三 (mL)		0.4
混匀，然后取出根样，吸干样本表面水分，放入新的离心管		
甲醇 (mL)	2	2
40℃ 浸泡 2h，取 1mL 于 1mL 玻璃比色皿，测定 A ₄₈₅ ， $\Delta A = A_{测定} - A_{空白}$ 。		

脱氢酶活力计算

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。

酶活单位定义：在 37℃ 时，每克样品每 min 催化产生 1 μg TTF 为一个酶活性单位。

$\text{DHA} (\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = (\Delta A + 0.0312) \div 0.0422 \times V_{\text{反应}} \div W \div T = 0.395 \times (\Delta A + 0.0312) \div W$

V 反应：反应总体积，2mL；T：培养时间，120min；W：样品质量，g。