

使用说明书

Instruction Manual

脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)活性检测试剂盒（微量法）

Dehydroascorbate Reductase Activity Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

脱氢抗坏血酸还原酶（dehydroascorbate reductase, DHAR）存在于细胞质、线粒体和叶绿体中。DHAR 催化 GSH 还原 DHA 生成 AsA 和 GSSG, 调控细胞 AsA/DHA 比值, 是抗坏血酸-谷胱甘肽氧化还原循环的关键酶。提高植物体内的 DHAR 活性, 可提高植物食品中 AsA 含量, 进而提高植物食品的营养品质。

检测原理

DHAR 催化 GSH 还原 DHA 生成 AsA, 通过测定 DHA 减少速率, 计算 DHAR 活性。

产品组成及储存条件

100T/96S 规格的产品组成如下:

组成	规格	储存条件
CB0065M-A	100mL×1 瓶	4℃保存。
CB0065M-B	15mL×1 瓶	4℃保存。
CB0065M-C	粉剂×1 瓶	-20℃避光保存, 临用前加入 2.5mL 蒸馏水充分溶解。
CB0065M-D	粉剂×1 瓶	4℃保存, 临用前加入 2.5mL 蒸馏水充分溶解。

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:

紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、低温离心机、研钵、水浴锅、可调式移液枪、冰和蒸馏水。

二、粗酶液提取:

1. 组织样本:

按照组织质量 (g): CB0065M-A 体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL CB0065M-A) 进行冰浴匀浆; 8000g, 4℃离心 10min, 取上清置冰上待测。

2. 细菌、细胞样本:

细菌、细胞: 按照细胞数量 (10^4 个): CB0065M-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL CB0065M-A), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 8000g 4℃离心 20min, 取上清液置冰上混匀待测。

3. 液体样本: 直接测定。

三、测定步骤:

- 紫外分光光度计/酶标仪预热 30 min, 调节波长到 265nm, 蒸馏水调零。
- CB0065M-B 在 25℃水浴锅中预热 30 min。
- 在微量石英比色皿/96 孔板中依次加入:

试剂名称	测定管 (μL)
上清液	20
CB0065M-C	20
CB0065M-D	20
CB0065M-B	140
迅速混匀后于 265nm 比色, 记录 30s 和 150s 的吸光值 A1 和 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

四、DHAR 活性计算公式:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按样本蛋白浓度计算

活性单位定义: 25℃中每毫克蛋白每分钟还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$\text{DHAR (U/mg prot)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 92 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本鲜重计算

活性单位定义: 25℃中每克样本每分钟还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$\text{DHAR (U/g)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 92 \times \Delta A \div W$$

3. 按细菌或细胞数量计算

活性单位定义: 25℃中每 10⁴ 个细胞每分钟还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$\text{DHAR (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 92 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

4. 按液体体积计算

活性单位定义: 25℃中每毫升样本每分钟还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$\text{DHAR (U/mL)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \div T = 92 \times \Delta A$$

注: ϵ : AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为 5.42×10^4 L/mol/cm; 10⁶: 摩尔分子换算成微摩尔分子; d: 比色杯光径, 1cm; V 反总: 反应体系总体积, 0.2mL = 2×10^{-4} L; V 样: 反应体系中加入上清液体积, 20μL = 0.02mL; V 样总: 提取液体积, 1mL; Cpr: 上清液蛋白浓度, mg/mL; W: 样品质量; T: 反应时间, 2 min。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 按样本蛋白浓度计算

活性单位定义: 25℃中每毫克蛋白每分钟还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$\text{DHAR (U/mg prot)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 184 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本质量计算

活性单位定义: 25℃中每克样本每分钟还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$\text{DHAR (U/g)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 184 \times \Delta A \div W$$

3. 按细菌或细胞数量计算

活性单位定义: 25℃中每 10⁴ 个细胞每分钟还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$\text{DHAR (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 184 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

4. 按液体体积计算

活性单位定义: 25℃中每毫升样本每分钟还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$\text{DHAR (U/mL)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \div T = 184 \times \Delta A$$

注: ϵ : AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为 5.42×10^4 L/mol/cm; 10⁶: 摩尔分子换算成微摩尔分子; d: 96 孔板光径, 0.5 cm; V 反总: 反应体系总体积, 0.2mL = 2×10^{-4} L; V 样: 反应体系中加入上清液体积, 20μL = 0.02mL; V 样总: 提取液体积, 1mL; Cpr: 上清液蛋白浓度, mg/mL; W: 样品质量; T: 反应时间, 2 min。

注意事项

1. 临用前配制的试剂未使用完的 4℃保存, 3 天内使用完。
2. 蛋白定量测定, 建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。

