

使用说明书

Instruction Manual

脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)活性检测试剂盒（分光光度法）

Dehydroascorbate Reductase Activity Assay Kit (Spectrophotometry)

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

50T/48S 规格的产品组成如下:

组成	规格	储存条件
CB0065S-A	50mL × 1 瓶	4℃保存。
CB0065S-B	35mL × 1 瓶	4℃保存。
CB0065S-C	粉剂 × 1 瓶	-20℃避光保存, 临用前加入 5mL 蒸馏水充分溶解。
CB0065S-D	粉剂 × 1 瓶	4℃保存, 临用前加入 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、1mL 石英比色皿、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): CB0065S-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL CB0065S-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、真菌: 按照细胞数量 (10^4 个): CB0065S-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL CB0065S-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:

1. 分光光度计预热 30 min, 调节波长到 265nm, 蒸馏水调零。

2. CB0065S-B 在 25℃水浴锅中预热 30 min。

3. 在 1mL 石英比色皿中依次加入:

试剂名称	测定管 (μL)
上清液	100
CB0065S-C	100
CB0065S-D	100
CB0065S-B	700
迅速混匀后于 265nm 比色, 记录 30s 和 150s 的吸光值 A1 和 A2, 计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

四、DHAR 活性计算公式:

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。

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

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。

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

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。

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

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。

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

注: ϵ : AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为 5.42×10^4 L/mol/cm; 10^9 : 摩尔分子换算成纳摩尔分子; d: 比色杯光径, 1 cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 1mL=0.001 L; $V_{\text{样}}$: 反应体系中加入上清液体积, 100μL=0.1mL; Cpr: 上清液蛋白浓度, mg/mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; W, 样本质量, g; 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)。
3. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
4. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

