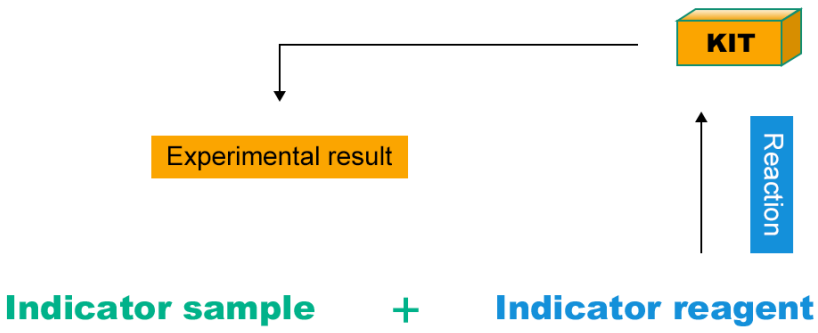
上海茁彩生物科技有限公司

ZCIBIO Technology Co.,Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO：ZC-S0337 Size：100T/96S

脱氢抗坏血酸（DHA）检测试剂盒说明书

微量法

***正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定**

一、测定意义：

AsA作为植物细胞一个重要生理指标，其AsA的含量、氧化还原状态(AsA/DHA 比率)及其合成与代谢相关酶类活性的变化涉及植物对一系列环境胁迫的响应。DHA是AsA的可逆的氧化型，在生物体内，与抗坏血酸共同组成氧化还原系统，具有电子受体的作用。

二、测定原理：

DTT 还原 DHA 生成 AsA，通过测定体系中 AsA 的生成速率，即可计算出 DHA 含量。

三、需自备的仪器和用品：

低温离心机、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板（ZC-1036：UV板）、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 100mL×1 瓶	室温保存	
试剂二	液体 16mL×1 瓶	室温保存	
试剂三	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入 5mL 蒸馏水充分溶解
标准品	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入 5.743mL 蒸馏水充分溶解；吸取 0.1 mL 上述溶液，加入 0.9 mL 蒸馏水，混匀，即为 100μmol/L DHA

五、样品中DHA提取：

1. 组织：按照组织质量（g）：试剂一体积(mL)为1：5~10的比例（建议称取约0.1g 组织，加入1mL试剂一）进行冰浴匀浆。12000g，4℃离心 20min，取上清置冰上待测。

2. 细菌、真菌：按照细胞数量（10^4个）：试剂一体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率300w，超声3秒，间隔7秒，总时间3min）；12000g，4℃离心 10min，取上清液置于冰上待测。

3. 血清等液体：直接测定。

六、DHA测定操作：

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

2. 试剂二在 25℃水浴锅中预热 30 min。

3. 标准管：依次在微量石英比色皿/96孔板加入20μL 标准液、160μL预热的试剂二和20μL试剂三，迅速混匀后于265nm比色，记录10s和130s的吸光值A1和A2，△A空白管=A2-A1。

4. 测定管：依次在微量石英比色皿/96孔板加入 20μL 上清液、160μL 预热的试剂二和 20μL试剂三，迅速混匀后于265nm比色，记录10s和130s的吸光值A3和A4，△A测定管=A4-A3。

注意：标准管只需测定一次。

七、计算公式：

- 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1). 按蛋白浓度计算

DHA(nmol/mg prot) =[C标准液×△A测定管÷△A标准管×V标准]÷（Cpr×V样）

=100×△A测定管÷△A标准管÷Cpr

(2). 按样本质量计算

DHA(nmol/g) =[C标准液×△A测定管÷△A标准管×V标准]÷(W×V样÷V样总)

=100×△A 测定管÷△A 标准管÷W

(3). 按细胞数量计算

DHA(nmol/10^4cell) =[C标准液×△A测定管÷△A标准管×V标准]÷(W×V样÷V样总)

=100×△A 测定管÷△A 标准管÷细胞数量

(4). 按液体体积计算

DHA(nmol/mL) =[C 标准液×△A 测定管÷△A 标准管×V 标准]÷V 样

=100×△A 测定管÷△A 标准管÷Cpr

C标准液：100μmol/L；V 样总：上清液总体积，1.0 mL=1×10^{-3}L；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量（g）。

- 使用 96 孔板测定的计算公式如下

(1). 按蛋白浓度计算

DHA(nmol/mg prot) =[C 标准液×△A 测定管÷△A 标准管×V 标准]÷（Cpr×V 样）

=100×△A 测定管÷△A 标准管÷Cpr

(2). 按样本质量计算

DHA(nmol/g) =[C 标准液×△A 测定管÷△A 标准管×V 标准]÷(W×V 样÷V 样总)

=100×△A 测定管÷△A 标准管÷W

(3). 按细胞数量计算

DHA(nmol/10^4cell) =[C标准液×△A测定管÷△A标准管×V标准]÷(W×V样÷V样总)

=100×△A 测定管÷△A 标准管÷细胞数量

(4). 按液体体积计算

DHA(nmol/mL) =[C 标准液×△A 测定管÷△A 标准管×V 标准]÷V 样

=100×△A 测定管÷△A 标准管÷Cpr

C 标准液：100μmol/L；V 样总：上清液总体积，1.0 mL=1×10^{-3} L；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量（g）。

八、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. 最低检出限为10μmol/L。