

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-S0341

Size: 100T/96S

脱氢抗坏血酸还原酶 (DHAR) 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:

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。

二、测定原理:

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

三、需自备的仪器和用品:

研钵、冰、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×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体×1 瓶	4°C 保存	
试剂三	粉剂×1 瓶 (棕色)	4°C 保存	临用前加入 2.5 mL 蒸馏水充分溶解
试剂四	粉剂×1 瓶	4°C 保存	临用前加入 2.5 mL 蒸馏水充分溶解

五、粗酶液提取：

1. 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。8000g, 4°C 离心 10min, 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); 8000g 4°C 离心 20min, 取上清液置冰上混匀待测。
3. 血清等液体: 直接测定。

六、DHAR 测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长到 265nm, 蒸馏水调零。
2. 试剂二在 25°C 水浴锅中预热 30min。
3. 在微量石英比色皿/96 孔板中依次加入 20 μ L 上清液、20 μ L 试剂三、20 μ L 试剂四和 140 μ L 试剂二, 迅速混匀后于 265nm 比色, 记录 30s 和 150s 的吸光值 A1 和 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。

七、DHAR 活性计算公式：

- 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

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

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

(2). 按样本质量计算

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

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

(3). 按细胞数量计算

活性单位定义: 25°C 中每 10^4 个细胞每分钟还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

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

(4) 按液体体积计算

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

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

ϵ : AsA在265nm处摩尔吸光系数为 $5.42 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$; 10^6 : 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, $0.2\text{mL}=2 \times 10^{-4} \text{L}$; V 样: 反应体系中加入上清液体积, $20 \mu\text{L}=0.02\text{mL}$; V 样总: 提取液体积, 1 mL; Cpr: 上清液蛋白浓度, mg/mL; W : 样品质量; T: 反应时间, 2 min。

● 使用96孔板测定的计算公式如下

(1). 按蛋白浓度计算

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

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

(2). 按样本质量计算

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

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

(3). 按细胞数量计算

活性单位定义: 25°C 中每 10^4 个细胞每分钟还原生成1nmol AsA为1个酶活单位。

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

(4). 按液体体积计算

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

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

ϵ : AsA在265nm处摩尔吸光系数为 $5.42 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$; 10^6 : 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, $0.2\text{mL}=2 \times 10^{-4} \text{L}$; V 样: 反应体系中加入上清液体积, $20 \mu\text{L}=0.02\text{mL}$; V 样总: 提取液体积, 1 mL; Cpr: 上清液蛋白浓度, mg/mL; W : 样品质量; T: 反应时间, 2 min。

八、注意事项:

临用前配制的试剂未使用完的 4°C 保存, 3天内使用完。