

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-S0614

Size: 50T/48S

## 脱氢抗坏血酸还原酶 (DHAR) 检测试剂盒说明书

### 分光光度法

\*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 存在于线粒体、细胞质和叶绿体中。DHAR 催化 GSH 还原 DHA 生成 AsA, 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 被还原量可计算得 DHAR 活性。

#### 三、需自备的仪器和用品:

研钵、冰、台式离心机、紫外分光光度计、1mL 石英比色皿、可调式移液器、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 50mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 35mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	粉剂×1 瓶 (棕色)	4°C保存	临用前加入 5mL 双蒸水充分溶解
试剂四	粉剂×1 瓶	4°C保存	临用前加入 5mL 双蒸水充分溶解

## 五、操作步骤：

### ● 粗酶液提取：

按照组织质量 (g)：试剂一体积 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。10000rpm, 4°C离心 10min, 取上清置冰上待测。

### ● DHAR 测定操作：

1. 分光光度计预热 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 以上。

3. 空白管：在 1mL 石英比色皿中依次加入 100 μL 蒸馏水、100 μL 试剂三、100 μL 试剂四和 700 μL 试剂二, 迅速混匀后于 265nm 比色, 记录 30s 和 150s 的吸光值 A1 和 A2,  $\Delta A=A2-A1$ 。

4. 测定管：在 1mL 石英比色皿中依次加入 100 μL 上清液、100 μL 试剂三、100 μL 试剂四和 700 μL 试剂二, 迅速混匀后于 265nm 比色, 记录 30s 和150s 的吸光值 A3 和A4,  $\Delta A=A4-A3$ 。

## 六、DHAR 活力计算：

### (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 1 μmol AsA 为 1U。

$DHAR (U/mg \text{ prot}) = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (C_{pr} \times V \text{ 样}) \div$

$T=0.092 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div C_{pr}$

### (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 1 μmol AsA 为 1U。

$DHAR (U/g) = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div$

$T=0.092 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$

$\epsilon$  : AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数,  $5.42 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$ ;  $10^6$ : 摩尔分子换算成微摩尔分子; d: 比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应体系总体积, 1mL=0.001L; V 样: 加入反应体系中上清液体积,  $100 \mu\text{L}=0.1\text{mL}$ ; Cpr: 上清液蛋白浓度, mg/ml; T: 反应时间, 2min。