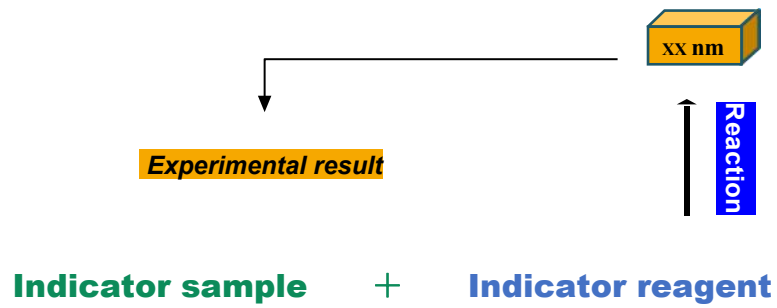


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

单脱氢抗坏血酸还原酶（MDHAR）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

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。

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。

实验中所需仪器及设备：

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（UV板）、可调式移液器和蒸馏水。

试剂组成和配制：

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℃保存	-
试剂二	液体×1瓶	4℃保存	-
试剂三	粉剂×1瓶（棕色）	4℃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℃保存	临用前加入2.5 mL蒸馏水充分溶解

粗酶液提取：

- 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℃离心 10min，取上清置冰上待测。
- 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℃离心 20min，取上清液置冰上混匀待测。
- 血清等液体：直接测定。

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℃水浴锅中预热30min。
3. 在微量石英比色皿/96孔板（UV板）中依次加入20 μL上清液、20 μL试剂三、20 μL试剂四和140 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， $\Delta A = A2 - A1$ 。

DHAR 活性计算公式：

a. 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℃中每毫克蛋白每分钟还原生成1nmol AsA为1个酶活单位。

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

(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。

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

(3). 按细胞数量计算

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。

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

(4) 按液体体积计算

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

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

ε : AsA在265nm处摩尔吸光系数为 $5.42 \times 10^4 \text{L}/\text{mol}/\text{cm}$; 10^6 : 摩尔分子换算成微摩尔分子; d: 比色杯光径, 1cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $0.2\text{mL} = 2 \times 10^{-4} \text{L}$; $V_{\text{样}}$: 反应体系中加入上清液体积, $20 \mu\text{L} = 0.02\text{mL}$; $V_{\text{样总}}$: 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。

b. 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℃中每毫克蛋白每分钟还原生成1nmol AsA为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{DHAR}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= \Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 184 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(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。

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

(3). 按细胞数量计算

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。

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

(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。

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

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; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $0.2 \text{ mL} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$; $V_{\text{样}}$: 反应体系中加入上清液体积, $20 \mu \text{ L} = 0.02 \text{ mL}$; $V_{\text{样总}}$: 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。

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。