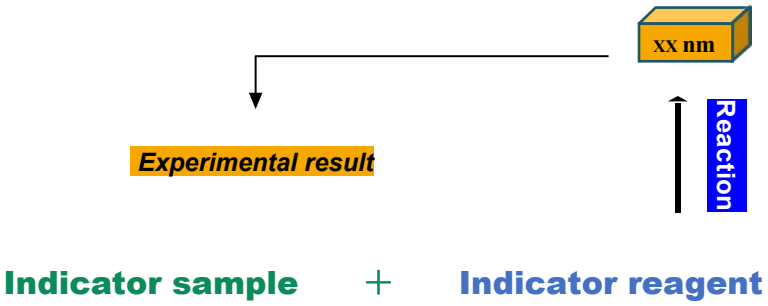
上海茁彩生物科技有限公司

Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

货号：ZC-S0341　　规格：100管/96样

脱氢抗坏血酸还原酶（DHAR）活性检测试剂盒说明书

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：

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℃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℃离心 20min，取上清液置冰上混匀待测。
3. 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孔板中依次加入20μL上清液、20μL试剂三、20μL试剂四和140μL试剂二，迅速混匀后于265nm比色，记录30s和150s的吸光值A1和A2，△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。

DHAR(nmol/min/mg prot) = △A÷ε÷d×V 反总×10^9÷(Cpr×V 样)÷T

= 92×△A ÷Cpr

(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。

DHAR(nmol/min/g) = △A÷ε÷d×V 反总×10^9÷(W×V 样÷V 样总)÷T

= 92×△A ÷W

(3). 按细胞数量计算

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

DHAR(nmol/min/10^4cell) = △A÷ε÷d×V 反总×10^9÷(细胞数量×V 样÷V 样总)÷T

= 92×△A ÷细胞数量

(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。

DHAR(nmol/min/mL) = △A÷ε÷d×V 反总×10^9÷V 样÷T

= 92×△A

ε ：AsA在265nm处摩尔吸光系数为5.42×10^4L/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，0.2mL=2×10^{-4} L；V 样：反应体系中加入上清液体积，20μL=0.02mL；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。

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。

DHAR(nmol/min/mg prot) = △A÷ε÷d×V 反总×10^9÷(Cpr×V 样)÷T

= 184×△A÷Cpr

(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。

DHAR(nmol/min/g) = △A÷ε÷d×V 反总×10^9÷(W×V 样÷V 样总)÷T

= 184×△A ÷W

(3). 按细胞数量计算

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

DHAR(nmol/min/10^4cell) = △A÷ε÷d×V 反总×10^9÷(细胞数量×V 样÷V 样总)÷T

= 184×△A ÷细胞数量

(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。

DHAR(nmol/min/mL) = △A÷ε÷d×V 反总×10^9÷V 样÷T

= 184×△A

ε：AsA在265nm处摩尔吸光系数为 5.42×10^4L/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，0.2mL=2×10^{-4} L；V 样：反应体系中加入上清液体积，20μL =0.02mL；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。

注意事项：

临用前配制的试剂未使用完的4℃保存，3天内使用完。