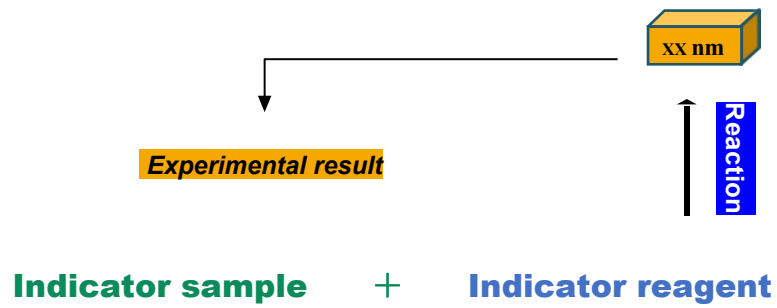


上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

## 脱氢抗坏血酸还原酶（DHAR）活性测定试剂盒说明书 分光光度法

注意：正式测定之前选择 2-3个预期差异大的样本做预测定。

### 二、产品内容

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℃保存	
试剂二	液体 35mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂三	粉剂×1 瓶（棕色）	4℃保存	临用前加入 5mL 双蒸水充分溶解
试剂四	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入 5mL 双蒸水充分溶解

### 试验中所需的仪器和试剂：

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。

### 产品说明：

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。

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。

### 操作步骤：

#### 一、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℃离心 10min，取上清置冰上待测。

### 二、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℃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， $\Delta A = A4 - A3$ 。

### 三、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 $\mu$ mol AsA 为 1U。

$$\text{DHAR (U/mg prot)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \\ = 0.092 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

#### (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 1 $\mu$ mol AsA 为 1U。

$$\text{DHAR (U/g)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (\text{W} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 0.092 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{W}$$

$\epsilon$ : AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数, 5.42 $\times 10^4$ 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 $\mu$ L=0.1mL;  $\text{Cpr}$ : 上清液蛋白浓度, mg/ml;  $T$ : 反应时间, 2min。