

脱氢抗坏血酸还原酶（dehydroascorbate reductase）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-VC007 微板法 96 样）

一、产品简介：

脱氢抗坏血酸还原酶（DHAR, EC 1.8.5.1）又名谷胱甘肽脱氢酶（抗坏血酸）（Glutathione Dehydrogenase (ascorbate)），存在于叶绿体、线粒体和细胞质中，是 AsA-GSH 循环中重要的酶，对维持细胞中抗坏血酸还原能力有重要作用。

DHAR 催化 GSH 还原 DHA 生成 AsA 和 GSSG，本试剂盒通过在 265nm 下检测 AsA 的生成速率来计算 DHAR 的酶活性大小。

二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 2 支	4℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部，再每支加 1.1mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存。
试剂三	粉剂 2 支	-20℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部，再每支加 1.1mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板（UV 板）、低温离心机、可调式移液器、研钵、冰。

四、脱氢抗坏血酸还原酶（DHAR）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注意】若样本颜色较深（如植物叶片），可引起起始值 A1 值较大如超过 2，可在样本制备过程中增加除色素步骤：取约 0.2g 组织（水分充足的样本可取 1g），加入 90%乙醇冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，弃掉色素较深的上清液；以上除色素步骤重复 2 次。最后向离心得到的沉淀中加入 1mL 提取液，混匀或再次冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

② 液体样本：直接测定。若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 打开酶标仪，设置温度 25℃，调节波长到 265nm。

② 试剂一在 25℃水浴锅中预热 20min。在 96 孔 UV 板中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管
样本	10
试剂一	150
试剂二	20
试剂三	20
轻轻混匀，25℃条件下，在 265nm 处，10s 和 3min10s 分别读值，相应记为 A1 和 A2，	

$$\Delta A = A_2 - A_1$$

- 【注】1.若 ΔA 值小于 0.01, 可适当延长反应时间 T (如由 3min10s 延长到 10min10s 或更长时间读取 A2)。或适当加大样本量 V1 (如 10 μ L 增至 40 μ L, 则试剂一相应减少), 则改变后的 T 和 V1 需代入公式重新计算。
- 2.若起始值 A 太大如超过 2 (如颜色较深的植物叶片, 一般色素较高, 则起始值相对会偏高), 可对叶片进行除色素处理 (参考样本制备阶段注意事项) 或适当减少样本加样量 V1 (如由 10 μ L 减至 5 μ L, 则试剂一相应增加), 则改变后的 V1 需代入公式重新计算。
- 3.若上升趋势不稳定, 可以每隔 10S 读取一次吸光值, 选取一段线性上升的时间段来参与计算, 相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、按蛋白浓度计算:

活性定义: 25°C条件下, 每毫克蛋白每分钟还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$\text{DHAR}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_2 \times 10^9) \div (\text{Cpr} \times V_1) \div T = 246 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本质量计算:

活性定义: 25°C条件下, 每克样本每分钟还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$\text{DHAR}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_2 \times 10^9 \div (W \times V_1 \div V) \div T = 246 \times \Delta A \div W$$

3、按液体体积计算:

活性定义: 25°C条件下, 每毫升样本每分钟还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$\text{DHAR}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_2 \times 10^9 \div V_1 \div T = 246 \times \Delta A$$

ϵ ---AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为 $5.42 \times 10^4 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$;

d ---96 孔板光径, 0.5 cm;

V ---提取液体积, 1 mL;

V2 ---反应体系总体积, 200 μ L= $2 \times 10^{-4} \text{ L}$;

V1 ---加入样本体积, 10 μ L =0.01mL;

W---样品质量, g;

T ---反应时间, 3min;

Cpr---上清液蛋白浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。