

脱氢抗坏血酸还原酶（dehydroascorbate reductase）试剂盒说明书 (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 mg×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 mg×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, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

-
- 【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℃条件下，每毫克蛋白每分钟还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$\text{DHAR}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=(\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9) \div (\text{Cpr} \times V1) \div T = 246 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本质量计算：

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

$$\text{DHAR}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9 \div (W \times V1 \div V) \div T = 246 \times \Delta A \div W$$

3、按液体体积计算：

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

$$\text{DHAR}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9 \div V1 \div T = 246 \times \Delta A$$

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。