

## 脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)活性检测试剂盒说明书

### Dehydroascorbate Reductase Activity Assay Kit

微量法

货号: AK327

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK327-A	100mL×1 瓶	-20℃保存;
AK327-B	20mL×1 瓶	-20℃保存;
AK327-C	粉剂×1 瓶 (棕色)	4℃保存。临用前加入 2.5 mL 蒸馏水充分溶解。
AK327-D	粉剂×1 瓶	4℃保存。临用前加入 2.5 mL 蒸馏水充分溶解。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 脱氢抗坏血酸还原酶 (dehydroascorbate reductase, 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。

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。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、蒸馏水。

粗酶液提取:

- 组织样本:  
按照组织质量 (g): AK327-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK327-A) 进行冰浴匀浆。8000g, 4℃ 离心 10min, 取上清置冰上待测。
- 细菌、真菌样本:  
细菌、真菌: 按照细胞数量 (10<sup>4</sup> 个): AK327-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL AK327-A), 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。
- 液体样本: 直接测定。

测定步骤

- 分光光度计/酶标仪预热 30 min, 调节波长到 265nm, 蒸馏水调零。
- AK327-B 在 25℃ 水浴锅中预热 30 min。
- 在微量石英比色皿/96 孔板中依次加入

试剂名称	测定管 (ul)
上清液	20
AK327-C	20
AK327-D	20
AK327-B	140
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. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

#### 1. 按样本蛋白浓度计算

活性单位定义: 25°C 中每毫克蛋白每分钟还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

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

#### 2. 按样本鲜重计算

活性单位定义: 25°C 中每克样本每分钟还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

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

#### 3. 按细菌或细胞密度计算

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

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

#### 4. 按液体体积计算

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

$$\text{DHAR (nmol/min/mL)} = \frac{\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{V_{\text{样}} \div T} = 92 \times \Delta A$$

**注:**  $\epsilon$ : AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为  $5.42 \times 10^4$  L/mol/cm;  $10^6$ : 摩尔分子换算成微摩尔分子; d: 比色杯光径, 1cm;  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积,  $0.2\text{mL} = 2 \times 10^{-4}$  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. 用 96 孔板测定的计算公式如下

#### 1. 按样本蛋白浓度计算

活性单位定义: 25°C 中每毫克蛋白每分钟还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

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

#### 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 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

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

#### 3. 按细胞数量计算

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

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

#### 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。

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

**注:**  $\epsilon$ : AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为  $5.42 \times 10^4$  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,  $0.2\text{mL} = 2 \times 10^{-4}$  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。