

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

分光光度法

货号: AK326

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK326-A	50mL×1 瓶	4℃保存;
AK326-B	35mL×1 瓶	4℃保存;
AK326-C	粉剂×1 瓶	-20℃避光保存, 临用前加入 5 mL 蒸馏水充分溶解
AK326-D	粉剂×1 瓶	4℃保存, 临用前加入 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:

紫外分光光度计、1ml 石英比色皿、低温离心机、研钵、水浴锅、可调式移液枪、冰和蒸馏水。

粗酶液提取:

1. 组织样本:

按照组织质量 (g): AK326-A 体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK326-A) 进行冰浴匀浆; 8000g, 4℃离心 10min, 取上清置冰上待测。

2. 细菌、细胞样本:

细菌、真菌: 按照细胞数量 (10^4 个): AK326-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL AK326-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。

3. 液体样本: 直接测定。

测定步骤

1. 分光光度计预热 30 min, 调节波长到 265nm, 蒸馏水调零。
2. AK326-B 在 25℃水浴锅中预热 30 min。
3. 在 1mL 石英比色皿中依次加入:

试剂名称	测定管 (ul)
上清液	100
AK326-C	100
AK326-D	100
AK326-B	700

迅速混匀后于 265nm 比色, 记录 30s 和 150s 的吸光值 A1 和 A2, 计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

DHAR 活性计算公式:

1. 按样本蛋白浓度计算

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。

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

2. 按样本鲜重计算

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。

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

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。

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

4. 按液体体积计算

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

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

注: ϵ : AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为 $5.42 \times 10^4 \text{ L/mol/cm}$; 10^9 : 摩尔分子换算成纳摩尔分子; d: 比色杯光径, 1 cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 1mL=0.001 L; $V_{\text{样}}$: 反应体系中加入上清液体积, 100 μ L=0.1mL; Cpr: 上清液蛋白浓度, mg/mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; W, 样本质量, g; 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。