



上海源叶生物科技有限公司  
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd  
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248  
网址: [www.shyuanye.com](http://www.shyuanye.com)  
邮箱: shyysw@sina.com

## 脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)活性检测试剂盒(微量法)

货号: R41968

规格: 100T/96S

有效期: 6个月

产品组成及保存条件:

| 编号   | 规格       | 储存条件                        |
|------|----------|-----------------------------|
| 试剂-A | 100mL×1瓶 | 2-8℃保存;                     |
| 试剂-B | 20mL×1瓶  | 2-8℃保存;                     |
| 试剂-C | 粉剂×1瓶    | -20℃避光保存, 临用前加入2.5mL蒸馏水充分溶解 |
| 试剂-D | 粉剂×1瓶    | 2-8℃保存, 临用前加入2.5mL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:

1. 组织样本:



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

## 2. 细菌、真菌样本:

细菌、真菌: 按照细胞数量 (10<sup>4</sup> 个): 试剂-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500万细胞加入 1mL 试剂-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/酶标仪预热 30 min, 调节波长到 265nm, 蒸馏水调零。
2. 试剂-B 在 25℃水浴锅中预热 30 min。
3. 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      |
| 试剂-C | 20      |
| 试剂-D | 20      |
| 试剂-B | 140     |

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

### 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℃中每毫克蛋白每分钟还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

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

#### 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。

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



### 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。

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

### 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。

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

注:  $\epsilon$ : AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为  $5.42 \times 10^4 \text{ L/mol/cm}$ ;  $10^6$ : 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,  $0.2\text{mL} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ;  $V_{\text{样}}$ : 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。

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

##### 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 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

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

##### 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。

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

##### 4. 按液体体积计算



上海源叶生物科技有限公司  
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd  
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248  
网址: [www.shyuanye.com](http://www.shyuanye.com)  
邮箱: shyysw@sina.com

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。

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

注:  $\epsilon$ : AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为  $5.42 \times 10^4 \text{ L/mol/cm}$ ;  $10^6$ : 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,  $0.2\text{mL} = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ;  $V_{\text{样}}$ : 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;  $C_{\text{pr}}$ : 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2-8°C保存, 3 天内使用完。



源叶