

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

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 测定意义:

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。

### 测定原理:

DHAR 催化 GSH 还原 DHA 生成 AsA, 通过测定 DHA 减少速率, 计算 DHAR 活性。

### 组成:

产品名称	VC013-50T/48S	Storage
试剂一: 液体	50ml	4°C
试剂二: 液体	35ml	4°C
试剂三: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂四: 粉剂	1 瓶	4°C
说明书	一份	

试剂三: 粉剂×1 瓶 (棕色), 4°C 保存。临用前加入 5ml 蒸馏水充分溶解。

试剂四: 粉剂×1 瓶, 4°C 保存。临用前加入 5ml 蒸馏水充分溶解。

### 自备仪器和用品:

研钵、冰、低温离心机、紫外分光光度计、1ml 石英比色皿、可调式移液器和蒸馏水。

### 粗酶液提取:

1. 按照组织质量 (g) : 试剂一体积 (ml) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1ml 试剂一) 进行冰浴匀浆。8000g, 4°C 离心 10min, 取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌: 按照细胞数量 ( $10^4$  个) : 试剂一体积 (ml) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1ml 试剂一), 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°C 离心 20min, 取上清液置冰上混匀待测。
3. 血清等液体: 直接测定。

### DHAR 测定操作:

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



1. 分光光度计预热 30 min, 调节波长到 265nm, 蒸馏水调零。
2. 试剂二在 25°C水浴锅中预热 30 min。
3. 在 1ml 石英比色皿中依次加入 100μl 试剂三、100μl 试剂四和 700μl 试剂二, 最后加 **100μl 上清液**, 迅速混匀后于 265nm 比色, 记录 30s 和 150s 的吸光值 A1 和 A2,  $\Delta A=A_2-A_1$ 。

### DHAR 活性计算公式:

#### (1). 按蛋白浓度计算

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。

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

#### (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。

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

#### (3). 按细胞数量计算

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

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

#### (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。

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

$\epsilon$ : AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为  $5.42 \times 10^4 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$ ;  $10^9$ : 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, 100μl=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°C保存, 3 天内使用完。

