

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

微量法 100T/96S

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	VC014-100T/96S	Storage
试剂一: 液体	100ml	4°C
试剂二: 液体	17.5ml	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 2.5 ml 蒸馏水充分溶解。

试剂四: 粉剂×1 瓶, 4°C 保存。临用前加入 2.5 ml 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/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、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。

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



DHAR 测定操作:

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. 试剂二在 25°C 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 20μl 试剂三、20μl 试剂四和 140μl 试剂二, 最后加 20μl 上清液迅速混匀后于 265nm 比色, 记录 30s 和 150s 的吸光值 A1 和 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。

DHAR 活性计算公式:

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(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 10^4 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。

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

ϵ : AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为 $5.42 \times 10^4 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$; 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. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

(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。

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

(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。

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

(3). 按细胞数量计算

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

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



(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。

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

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

