

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

(货号: G0212W 微板法 96 样)

一、产品简介:

脱氢抗坏血酸还原酶 (DHAR, EC 1.8.5.1) 又名谷胱甘肽脱氢酶 (抗坏血酸) (Glutathione Dehydrogenase (ascorbate)), 存在于叶绿体、线粒体和细胞质中, 是 AsA-GSH 循环中重要的酶, 对维持细胞中抗坏血酸还原能力有重要作用。

DHAR 催化 GSH 还原 DHA 生成 AsA 和 GSSG, 本试剂盒通过在 265nm 下检测 AsA 的生成速率来计算 DHAR 的酶活性大小。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4℃ 保存	用前甩几下或 4℃ 离心使试剂落入试管底部, 再加 2.2 mL 蒸馏水溶解。
试剂三	粉剂 mg×1 瓶	4℃ 保存	用前甩几下或 4℃ 离心使试剂落入试管底部, 再加 2.2 mL 蒸馏水溶解。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板 (UV 板)、低温离心机、可调式移液器、研钵、冰。

四、脱氢抗坏血酸还原酶 (DHAR) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取

② 液体样本: 直接测定。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30 min, 调节波长到 265nm。

② 试剂一在 25℃ 水浴锅中预热 30 min。

③ 在 96 孔 UV 板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	150
试剂二	20
试剂三	20
轻轻混匀, 在 265nm 处, 10S 和 3min10S 分别读值, 相应记为 A1 和 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】1. 若 ΔA 的值在零附近, 可以适当延长反应时间到 10min10s 读取 A2, 改变后的反应时间需代入计算公式重新计算。或适当加大样本量, 则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。

2. 若起始值 A 太大如超过 2 (如颜色较深的植物叶片, 一般色素较高, 则起始值相对会偏高),

可以适当减少样本加样量，则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。

3. 若上升趋势不稳定，可以每隔 10S 读取一次吸光值，选取一段线性上升的时间段来参与计算，相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按蛋白浓度计算

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。

$$\begin{aligned} \text{DHAR}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A \div \epsilon \div d \times V_2 \times 10^9) \div (\text{Cpr} \times V_1) \div T \\ &= 246 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2、按样本质量计算

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。

$$\begin{aligned} \text{DHAR}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= \Delta A \div \epsilon \div d \times V_2 \times 10^9 \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ &= 246 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

3、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。

$$\begin{aligned} \text{DHAR}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) &= \Delta A \div \epsilon \div d \times V_2 \times 10^9 \div V_1 \div T \\ &= 246 \times \Delta A \end{aligned}$$

ϵ ---AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为 5.42×10^4 L/mol /cm;

d ---96 孔板光径，0.5 cm;

V ---提取液体积，1 mL;

V2 ---反应体系总体积， $200\mu\text{L}=2 \times 10^{-4}$ L;

V1 ---加入样本体积， $10\mu\text{L}=0.01\text{mL}$;

W---样品质量;

T ---反应时间，3min;

Cpr---上清液蛋白浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。