

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

（货号：BP10226W 微板法 96 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
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 2 支	-20℃ 避光保存	每支： 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂分装后-20℃ 保存。
试剂三	粉剂 2 支	-20℃ 保存	每支： 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂分装后-20℃ 保存。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板（UV 板）、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

- 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。

【注意】若样本颜色较深（如植物叶片），可引起起始值 A1 值较大如超过 2，可在样本提取过程中增加除色素步骤：取约 0.2g 组织（水分充足的样本可取 1g），加入 90%乙醇冰浴匀浆，12000rpm，4℃ 离心 10min，弃掉色素较深的上清液；以上除色素步骤重复 2 次。最后向离心得到的沉淀中加入 1mL 提取液，混匀或再次冰浴匀浆，12000rpm，4℃ 离心 10min，取上清置冰上待测。

- ② 液体样本：直接测定。若浑浊，离心后取上清检测。

2、检测步骤：

- ① 打开酶标仪，设置温度 25℃，调节波长到 265nm。
- ② 试剂一在 25℃ 水浴锅中预热 20min。在 96 孔 UV 板中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	150

试剂二	20
试剂三	20
轻轻混匀，25℃条件下，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 值小于 0.01，可适当延长反应时间 T（如由 3min10s 延长到 10min10s 或更长时间读取 A2）。或适当加大样本量 V1（如 10 μ L 增至 40 μ L，则试剂一相应减少），则改变后的 T 和 V1 需代入公式重新计算。
- 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），可对叶片进行除色素处理（参考样本提取阶段注意事项）或适当减少样本加样量 V1（如由 10 μ L 减至 5 μ L，则试剂一相应增加），则改变后的 V1 需代入公式重新计算。
- 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：

活性定义：25℃条件下，每毫克蛋白每分钟还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$\text{DHAR}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9) \div (\text{Cpr} \times V1) \div T = 246 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本质量计算：

活性定义：25℃条件下，每克样本每分钟还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$\text{DHAR}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = \Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9 \div (W \times V1 \div V) \div T = 246 \times \Delta A \div W$$

3、按液体体积计算：

活性定义：25℃条件下，每毫升样本每分钟还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$\text{DHAR}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = \Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9 \div V1 \div T = 246 \times \Delta A$$

ϵ ---AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为 $5.42 \times 10^4 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$;

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 μ L= $2 \times 10^{-4} \text{ L}$;

V1 ---加入样本体积，10 μ L =0.01mL;

W---样品质量，g;

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。