

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

微量法 100T/96S

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

实验中所需仪器及设备：

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。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：液体 17.5mL×1 瓶，4℃保存。

试剂三：粉剂×1 瓶（棕色），4℃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℃保存。临用前加入 2.5 mL 蒸馏水充分溶解。

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℃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℃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：

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℃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℃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℃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℃中每 10⁴ 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℃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℃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℃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℃中每 10⁴ 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℃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； Cpr ：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℃ 保存, 3 天内使用完。