

## 脱氢抗坏血酸（dehydroascorbate, DHA）含量测定试剂盒说明书

### 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：

AsA作为植物细胞一个重要生理指标，其AsA的含量、氧化还原状态(AsA/DHA比率)及其合成与代谢相关酶类活性的变化涉及植物对一系列环境胁迫的响应。DHA是AsA的可逆的氧化型，在生物体内，与抗坏血酸共同组成氧化还原系统，具有电子受体的作用。

#### 测定原理：

DTT还原DHA生成AsA，通过测定体系中AsA的生成速率，即可计算出DHA含量。

#### 自备仪器和用品：

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、研钵、冰和蒸馏水。

#### 试剂组成和配制：

试剂一：液体100 mL×1瓶，室温保存。

试剂二：液体16mL×1瓶，室温保存。

试剂三：粉剂×1瓶，4℃保存。临用前加入5mL蒸馏水充分溶解。

标准品：粉剂×1瓶，4℃保存。临用前加入5.743 mL蒸馏水充分溶解；吸取0.1 mL上述溶液，加入0.9 mL蒸馏水，混匀，即为100μmol/L DHA。

#### 样品中DHA提取：

组织：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。12000g，4℃离心20min，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）；12000g，4℃离心10min，取上清液置于冰上待测。

3. 血清等液体：直接测定。

#### DHA测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热30 min，调节波长到265 nm，蒸馏水调零。

2. 试剂二在25℃水浴锅中预热30 min。

3. **标准管**：依次在微量石英比色皿/96孔板加入20μL标准液、160μL预热的试剂二和20μL试剂三，迅速混匀后于265nm比色，记录10s和130s的吸光值A1和A2， $\Delta A$ 空白管=A2-A1。

4. **测定管**：依次在微量石英比色皿/96孔板加入20μL上清液、160μL预热的试剂二和20μL试剂三，迅速混匀后于265nm比色，记录10s和130s的吸光值A3和A4， $\Delta A$ 测定管=A4-A3。

注意：标准管只需测定一次。

#### 脱氢抗坏血酸（dehydroascorbate, DHA）含量测定试剂盒说明书计算公式：

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

$$\text{DHA}(\text{nmol}/\text{mg prot}) = [\text{C标准液} \times \Delta\text{A测定管} \div \Delta\text{A标准管} \times \text{V标准}] \div (\text{Cpr} \times \text{V样})$$

$$= 100 \times \Delta\text{A测定管} \div \Delta\text{A标准管} \div \text{Cpr}$$

(2). 按样本质量计算

$$\text{DHA}(\text{nmol}/\text{g 鲜重}) = [\text{C标准液} \times \Delta\text{A测定管} \div \Delta\text{A标准管} \times \text{V标准}] \div (\text{W} \times \text{V样} \div \text{V样总})$$

$$= 100 \times \Delta\text{A测定管} \div \Delta\text{A标准管} \div \text{W}$$

(3). 按细胞数量计算

$$\text{DHA}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = [\text{C标准液} \times \Delta\text{A测定管} \div \Delta\text{A标准管} \times \text{V标准}] \div (\text{W} \times \text{V样} \div \text{V样总})$$

$$= 100 \times \Delta\text{A测定管} \div \Delta\text{A标准管} \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

$$\text{DHA}(\text{nmol}/\text{mL}) = [\text{C标准液} \times \Delta\text{A测定管} \div \Delta\text{A标准管} \times \text{V标准}] \div \text{V样}$$

$$= 100 \times \Delta\text{A测定管} \div \Delta\text{A标准管}$$

C标准液：100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ；V样总：上清液总体积，1.0 mL=1 $\times 10^{-3}$  L；V标准：加入标准品体积，0.02mL；V样：加入样本体积，0.02mL；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量（g）。

b.使用96孔板测定的计算公式如下

(1). 按蛋白浓度计算

$$\text{DHA}(\text{nmol}/\text{mg prot}) = [\text{C标准液} \times \Delta\text{A测定管} \div \Delta\text{A标准管} \times \text{V标准}] \div (\text{Cpr} \times \text{V样})$$

$$= 100 \times \Delta\text{A测定管} \div \Delta\text{A标准管} \div \text{Cpr}$$

(2). 按样本质量计算

$$\text{DHA}(\text{nmol}/\text{g 鲜重}) = [\text{C标准液} \times \Delta\text{A测定管} \div \Delta\text{A标准管} \times \text{V标准}] \div (\text{W} \times \text{V样} \div \text{V样总})$$

$$= 100 \times \Delta\text{A测定管} \div \Delta\text{A标准管} \div \text{W}$$

(3). 按细胞数量计算

$$\text{DHA}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = [\text{C标准液} \times \Delta\text{A测定管} \div \Delta\text{A标准管} \times \text{V标准}] \div (\text{W} \times \text{V样} \div \text{V样总})$$

$$= 100 \times \Delta\text{A测定管} \div \Delta\text{A标准管} \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

$$\text{DHA}(\text{nmol}/\text{mL}) = [\text{C标准液} \times \Delta\text{A测定管} \div \Delta\text{A标准管} \times \text{V标准}] \div \text{V样}$$

$$= 100 \times \Delta\text{A测定管} \div \Delta\text{A标准管}$$

C标准液：100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ；V样总：上清液总体积，1.0 mL=1 $\times 10^{-3}$  L；V标准：加入标准品体积，0.02mL；V样：加入样本体积，0.02mL；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量（g）。

**注意事项：**

1. 临用前配制的试剂未使用完的4 $^{\circ}\text{C}$ 保存，3天内使用完。
2. 最低检出限为10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。

