

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。

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。

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。

脱氢抗坏血酸还原酶（dehydroascorbate reductase, DHAR）试剂盒说明书粗酶液提取：

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°C中每克样本每分钟还原生成1nmol AsA 为1个酶活单位。

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

(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。

$$\begin{aligned} \text{DHAR}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= \Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 92 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(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。

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

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； C_{pr} ：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。

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

(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。

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

(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。

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

(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。

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

ε : AsA在265nm处摩尔吸光系数为 5.42×10^4 L/mol/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反总: 反应体系总体积, $0.2\text{mL} = 2 \times 10^{-4}$ L; V样: 反应体系中加入上清液体积, $20\mu\text{L} = 0.02\text{mL}$; V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°C 保存, 3天内使用完。