

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 (10⁴ 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。

$$\text{DHAR (nmol/min/mg prot)} = \frac{\Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反应} \times 10^9}{(\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T} \\ = 92 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

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

(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。

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

(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。

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

ϵ : AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为 5.42×10⁴ L/mol /cm; 10⁶: 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, 0.2mL=2×10⁻⁴ L; $V_{\text{样}}$: 反应体系中加入上清液体积, 20μL=0.02mL; $V_{\text{样总}}$: 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℃中每毫克蛋白每分钟还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

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

(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。

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

(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。

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

(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。

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

ϵ : AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为 5.42×10⁴ L/mol /cm; 10⁶: 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, 0.2mL=2×10⁻⁴ L; $V_{\text{样}}$: 反应体系中加入上清液体积, 20μL=0.02mL; $V_{\text{样总}}$: 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。

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。