

脱氢抗坏血酸还原酶（DHAR）活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1370

产品规格：100管/48样

产品简介：

脱氢抗坏血酸还原酶（Dehydroascorbate reductase, DHAR）是植物体内一种重要的抗氧化酶，是抗坏血酸-谷胱甘肽氧化循环中促进抗坏血酸再生的关键酶。DHAR在循环中利用抗坏血酸维持植物体内抗坏血酸的正常代谢水平，保护细胞组分抵御氧化损伤方面发挥着重要作用。

DHAR催化还原型谷胱甘肽（GSH）还原脱氢抗坏血酸（DHA）生成AsA，GSH能和5,5'-二硫代-双-（2-硝基苯甲酸）（DTNB）反应产生2-硝基-5-巯基苯甲酸（TNB）和谷胱甘肽二硫化物（GSSG）。TNB在波长412nm处具有最大光吸收。通过测定GSH的减少速率，计算DHAR活性。

注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品内容：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体110mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体20mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1瓶	-20℃
试剂三	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂四	液体8mL×1瓶	2-8℃
标准品	粉剂×1支	2-8℃

溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入3mL蒸馏水充分溶解，用不完的试剂-20℃分装保存2周。
2. 试剂三：粉剂置于试剂瓶内EP管中。临用前加入3.5mL 蒸馏水充分溶解，4℃保存。
3. 标准品：临用前加入1mL蒸馏水，配制成10mg/mL的标准溶液。

需自备的仪器和用品：

研钵/匀浆器、冰、低温离心机、可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、微量玻璃比色皿/96孔板、可调式移液器和蒸馏水。

操作步骤：

一、样品处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）1：5-10的比例（建议称取约0.1 g组织，加提取液1mL），冰上充分研磨匀浆，8000 g，4℃，离心10min，取上清液置于冰上待测。
2. 细菌、细胞：按照细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为500-1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL提取液），冰浴超声破碎细胞（功率300w，超声3s，间隔7s，总时间3min）；然后8000g，4℃，离心10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清等液体：直接检测。

二、测定操作



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

1. 分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长到412nm，蒸馏水调零。
2. 标准溶液的配制：将10mg/mL标准液用蒸馏水稀释为0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.015625 mg/mL的标准溶液备用。
3. 加样表

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	空白管	空白对照管	标准管	标准对照管
样本	20	20	-	-	-	-
标准溶液	-	-	-	-	20	-
蒸馏水	-	-	-	-	-	20
试剂一	100	140	120	160	140	140
试剂二	20	-	20	-	-	-
试剂三	20	-	20	-	-	-
试剂四	40	40	40	40	40	40

混匀，25℃放置20min 后测定各管412nm处吸光度，分别记为A测定管和A对照管、A空白管、A空白对照管、A标准管及A标准空白管。 $\Delta A = (A_{\text{空白管}} - A_{\text{空白对照管}}) - (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}})$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{标准空白管}}$ 。（空白管、空白对照管、标准管及标准空白管只需检测1-2次）

三、DHAR活性计算

1. 标准曲线的绘制：以各个标准溶液的浓度为x轴，其对应的 ΔA 标准为y轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 带入方程得到 x (mg/mL)。

2. DHAR活性的计算：

- (1) 按蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克蛋白每分钟催化1μg GSH氧化为1个酶活力单位。

$$\text{DHAR (U/mg prot)} = x \times V_{\text{提取}} \div (V_{\text{提取}} \times C_{\text{pr}}) \times 10^3 \div T = 50x \div C_{\text{pr}}$$

- (2) 按样本质量计算：

酶活定义：每克样本每分钟催化1μg GSH氧化为1个酶活力单位。

$$\text{DHAR (U/g质量)} = x \times V_{\text{提取}} \div W \times 10^3 \div T = 50x \div W$$

- (3) 按细胞数量计算：

酶活定义：每10⁴个细胞（细菌）每分钟催化1μg GSH氧化为1个酶活力单位。

$$\text{DHAR (U/10}^4\text{cell)} = x \times V_{\text{提取}} \div \text{细胞数量 (万个)} \times 10^3 \div W \div T = 50x \div \text{细胞数量 (万个)}$$

- (4) 按血清等液体计算：

酶活定义：每mL样本每分钟催化1μg GSH氧化为1个酶活力单位。

$$\text{DHAR (U/mL)} = x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \times 10^3 \div T = 50x$$

V提取：提取液体积，1mL；10³：单位换算系数，1mg=10³μg；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL，蛋白浓度自行测定；W：样本质量，g；T：反应时间：20min；V样：加入样本体积，0.02mL。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com