Dehydroascorbate Reductase (DHAR) Kit

脱氢抗坏血酸还原酶（DHAR）试剂盒说明书

货号：BN72586| 方法：紫外分光法 | 规格：48 样

一、产品简介：

脱氢抗坏血酸还原酶（DHAR，EC 1.8.5.1）又名谷胱甘肽脱氢酶（抗坏血酸）（Glutathione Dehydrogenase (ascorbate)），存在于叶绿体、线粒体和细胞质中，是 AsA-GSH 循环中重要的酶，对维持细胞中抗坏血酸还原能力有重要作用。

DHAR 催化 GSH 还原 DHA 生成 AsA 和 GSSG，本试剂盒通过在 265nm 下检测 AsA 的生成速率来计算 DHAR 的酶活性大小。

二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部，再加 4.4mL 蒸馏水溶解。
试剂三	粉剂 mg×1 瓶	-20℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部，再加 4.2mL 蒸馏水溶解。

三、所需的仪器和用品：

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿（光径 1cm）、低温离心机、可调式移液器、研钵

四、脱氢抗坏血酸还原酶（DHAR）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：

取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注意】 若样本颜色较深（如植物叶片），可引起起始值 A1 值较大如超过 2，可在样本制备过程中增加除色素步骤：取约 0.2g 组织（水分充足的样本可取 1g），加入 90%乙醇冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，弃掉色素较深的上清液；以上除色素步骤重复 2 次。最后向离心得到的沉淀中加入 1mL 提取液，混匀或再次冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

② 液体样本：直接测定。若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 紫外分光光度计预热 30 min，调节波长到 265nm，蒸馏水调零。

② 试剂一在 25℃水浴锅中预热 20 min。

③ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管
样本	40
试剂一	600
试剂二	80
试剂三	80

轻轻混匀，25℃条件下，在 265nm 处，10s 和 3min10s 分别读值，相应记为 A1 和 A2，△A=A2-A1。

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；
针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

1、按蛋白浓度计算：

活性定义：25℃条件下，每毫克蛋白每分钟还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

DHAR(nmol/min/mg prot)=(△A÷ε÷d×V2×10^9)÷(Cpr×V1)÷T=123×△A ÷Cpr

2、按样本质量计算：

活性定义：25℃条件下，每克样本每分钟还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

DHAR(nmol/min/g 鲜重)=△A÷ε÷d×V2×10^9÷(W×V1÷V)÷T=123×△A ÷W

3、按液体体积计算：

活性定义：25℃条件下，每毫升样本每分钟还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

DHAR(nmol/min/mL)=△A÷ε÷d×V2×10^9÷V1÷T=123×△A

ε ---AsA 在 265nm 处摩尔吸光系数为 5.42×10^4 L/mol /cm；

d ---96 孔板光径，1cm；　　V ---提取液体积，1 mL；

V2 ---反应体系总体积，800μL=8×10^{-4} L；　　V1 ---加入样本体积，40μL =0.04mL；

W---样品质量，g；　　T ---反应时间，3min；

Cpr---上清液蛋白浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。