

Dehydroascorbate Reductase Activity Assay Kit

脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)活性检测试剂盒 微板法

产品编号	产品名称	规格
BL1763B	脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)活性检测试剂盒 微板法	96T

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。

产品组成:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	120mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	15mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉末×2 瓶	4°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解。
试剂三	粉末×2 瓶	-20°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解。

使用方法:

一、样本准备

1. 组织样本:

- (a) 取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆;
- (b) 12000rpm, 4°C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°C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°C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。

二、样品测定

1. 酶标仪设置温度 25°C, 调节波长到 265nm。
2. 试剂一在 25°C水浴锅中预热 20min。
3. 在 96 孔 UV 板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	150
试剂二	20
试剂三	20
轻轻混匀, 25°C条件下, 在 265nm 处, 10s	

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。



和 3min10s 分别读值，相应记为 A1 和 A2，
 $\Delta A = A2 - A1$ 。

- 【注】：1.若 ΔA 值小于 0.01，可适当延长反应时间 T（如由 3min10s 延长到 10min10s 或更长时间读取 A2）。或适当加大样本量 V1（如 10 μ L 增至 40 μ L，则试剂一相应减少），则改变后的 T 和 V1 需代入公式重新计算。
- 2.若起始值 A 太大如超过 2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值相对会偏高），可对叶片进行除色素处理（参考样本制备阶段注意事项）或适当减少样本加样量 V1（如由 10 μ L 减至 5 μ L，则试剂一相应增加），则改变后的 V1 需代入公式重新计算。
- 3.若上升趋势不稳定，可以每隔 10S 读取一次吸光值，选取一段线性上升的时间段来参与计算，相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

三、结果计算

1. 按蛋白浓度计算：

活性定义：25 $^{\circ}$ C 条件下，每毫克蛋白每分钟还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$\text{DHAR}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A \div \varepsilon \div d \times V2 \times 10^9) \div (\text{Cpr} \times V1) \div T = 246 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按样本质量计算：

活性定义：25 $^{\circ}$ C 条件下，每克样本每分钟还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$\text{DHAR}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = \Delta A \div \varepsilon \div d \times V2 \times 10^9 \div (W \times V1 \div V) \div T = 246 \times \Delta A \div W$$

3. 按液体体积计算：

活性定义：25 $^{\circ}$ C 条件下，每毫升样本每分钟还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$$\text{DHAR}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = \Delta A \div \varepsilon \div d \times V2 \times 10^9 \div V1 \div T = 246 \times \Delta A$$

V1---加入样本体积，10 μ L = 0.01mL

V2---反应体系总体积，200 μ L = 2 \times 10 $^{-4}$ L

Cpr---上清液蛋白浓度，mg/mL

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

V---加入提取液体积，1mL

W---样品质量，g

T---反应时间，3min

d---96 孔板光径，0.5cm

注意事项：

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期：

-20 $^{\circ}$ C 保存六个月。

