

脱氢抗坏血酸还原酶（DHAR）检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1035

保存：-20℃避光保存 12 个月

规格：48T/96T

适用样本：动植物组织、细胞、细菌、液体样本

产品简介

脱氢抗坏血酸还原酶（Dehydroascorbate Reductase, DHAR）是一个在植物和部分动物组织中非常重要的酶，它在维持细胞的抗氧化防御系统中扮演着核心角色。DHAR 存在于细胞质、线粒体和叶绿体中，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。本试剂盒提供了一种简便的比色测定法，用于测定样本中的 DHAR 活性。其原理是 DHAR 催化 2 分子 GSH 还原 1 分子 DHA 生成 1 分子 AsA 和 1 分子 GSSG，GSH 能与 DTNB 反应生成黄色产物，在 412nm 处有最大光吸收。通过测定 GSH 减少速率，计算 DHAR 活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
试剂一	50mL	100mL	4℃ 保存
试剂二	10mL	20mL	4℃ 保存
试剂三	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃避光保存
试剂四	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4℃避光保存
试剂五	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4℃避光保存
标准品	粉剂×1 支	粉剂×1 支	4℃避光保存

自备耗材

酶标仪或可见光分光光度计（能测 412nm 处的吸光度）及水浴锅

96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头

制冰机、低温离心机

去离子水

匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

试剂一：即用型；4℃ 保存。

试剂二：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

试剂三：临用前每瓶加入 1.25mL 去离子水充分溶解，现用现配。用不完的试剂分装后-20℃ 保存；避免反复冻融。

试剂四：临用前 48T 加入 1.5mL 去离子水，96T 加入 3mL 去离子水充分溶解；4℃ 避光保存。

试剂五：使用前 96T 加入 5mL 去离子水，48T 加 2.5mL 去离子水溶解；4℃ 避光保存。

标准品制备：

50mM GSH 标准品：每管标准品含 15.4mg GSH，使用时加 1mL 去离子水得 50mM GSH 标准品，4℃ 避光保存。

2500μM GSH 标准品：取 50 μL 50mM GSH 标准品用 950 μL 去离子水稀释。

产品说明书

标准曲线设置：使用 2500 μ M GSH 标准品，按照下表所示，进一步稀释标准品：

	标准品体积 (μ L)	去离子水体积 (μ L)	标准品浓度 (μ M)
Std. 1	200 μ L 2500 μ M	0	2500
Std. 2	100 μ L of Std. 1 (2500 μ M)	100	1250
Std. 3	100 μ L of Std. 2 (1250 μ M)	100	625
Std. 4	100 μ L of Std. 3 (625 μ M)	100	312.5
Std. 5	100 μ L of Std. 4 (312.5 μ M)	100	156.25
Std. 6	100 μ L of Std. 5 (156.25 μ M)	100	78.13
Std. 7	100 μ L of Std. 6 (78.13 μ M)	100	39.06

注意：每次实验，请使用新配制的标准品；配制好的标准品需要在 4h 之内使用。

样本制备

组织：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一，冰浴匀浆。8,000g，4℃离心 10min，取上清液置冰上待测。

细胞或细菌：收集 5×10^6 个细胞或细菌，用冷 PBS 清洗细胞或细菌后弃上清，加入 1mL 试剂一，冰浴超声波破碎 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次）。8,000g 4℃离心 10min，取上清待测。

液体样品：直接测定，根据预实验确定稀释倍数。

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或紫外分光光度计预热30min以上，调节波长到412nm，紫外分光光度计去离子水调零。

2. 试剂二在 25℃中预热 15min。

1. 在 96 孔板或微量玻璃比色皿中按照如下方式加样：

试剂 (μ L)	测定孔	对照孔	空白孔	空白对照孔	标准孔	标准空白孔
样本	20	20	0	0	0	0
去离子水	0	0	0	0	0	20
标准品	0	0	0	0	20	0
试剂二	100	140	120	160	140	140
试剂三	20	0	20	0	0	0
试剂四	20	0	20	0	0	0
试剂五	40	40	40	40	40	40

充分混匀，25℃避光孵育 5min 后记录 412nm 处的吸光度。计算 $\Delta A_{\text{测}} = (A_{\text{空白}} - A_{\text{空白对照}}) - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})$ ， $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{标准空白}}$ （空白、空白对照、标准、标准空白只需做 1 次）。

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 $\Delta A_{\text{测}}$ 小于 0.005 可适当加大样本量。如果 $\Delta A_{\text{测}}$ 大于 2.0 或 $A_{\text{对照}}$ 大于 1.0，样本可用试剂一进一步稀释，计算结果乘以最终稀释倍数。

结果计算

1. 标准曲线的绘制

以标准品浓度为 y 轴， $\Delta A_{\text{标}}$ 为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。将样本的 $\Delta A_{\text{测}}$ 代入方程得到 y 值（1 μ M=1nmol/mL）。

产品说明书

2. DHAR 活性计算:

1) 按样本质量计算

活性单位定义: 每 g 组织在反应体系中每分钟催化 2nmol GSH 还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位 U。

$$\text{DHAR (U/g 鲜重)} = y \div 2 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = y \div W$$

2) 按细胞数量计算

活性单位定义: 每 10^4 个细胞在反应体系中每分钟催化 2nmol GSH 还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位 U。

$$\text{DHAR (U/10}^4 \text{ Cells)} = y \div 2 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.002y$$

3) 按液体体积计算

活性单位定义: 每 mL 液体样本在反应体系中每分钟催化 2nmol GSH 还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位 U。

$$\text{DHAR (U/mL)} = y \div 2 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = y$$

4) 按样本蛋白浓度计算

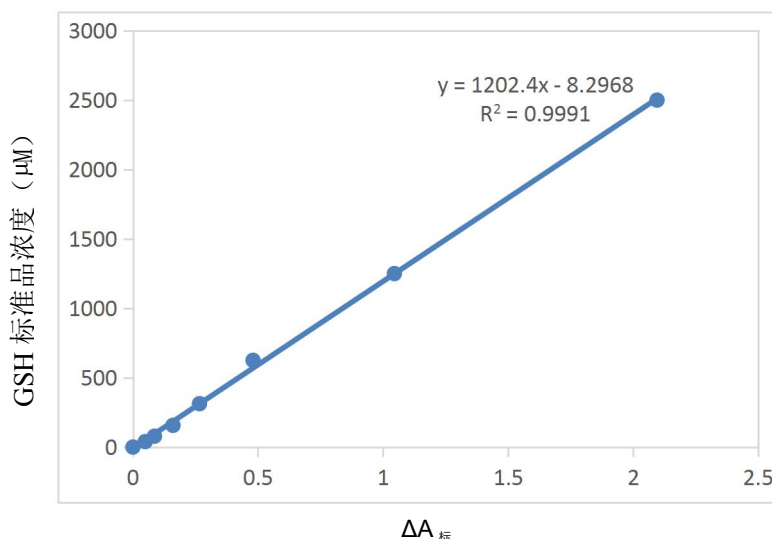
活性单位定义: 每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化 2nmol GSH 还原生成 1nmol AsA 为 1 个酶活单位 U。

$$\text{DHAR (U/mg prot)} = y \div 2 \times V_{\text{反总}} \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T = y \div Cpr$$

2: 2nmol GSH 还原生成 1nmol AsA; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $200 \mu\text{L} = 0.2\text{mL}$; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积, 0.02mL ; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1mL ; W : 样本质量, g; Cpr : 上清液蛋白质浓度, mg/mL ; T : 催化反应时间, 5min ; 500: 细胞数量, 5×10^6 。

结果展示

典型标准曲线



注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验, 尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究, 如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途, 我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用, 并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用; 否则, 可能导致结果异常。
5. 勤换吸头, 避免各组分之间的交叉污染。

相关产品:

PMK1030 还原型抗坏血酸 (AsA) / 维生素 C 检测试剂盒 (微量法)

PMK1034 抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 检测试剂盒 (微量法)



更多产品详情了解, 请关注公众号: