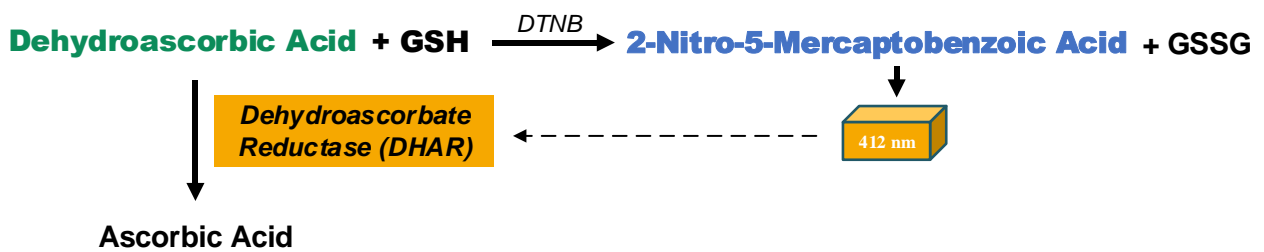




脱氢抗坏血酸还原酶 (DHAR) 活性检测试剂盒  
Dehydroascorbate Reductase (DHAR) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司  
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



## 脱氢抗坏血酸还原酶 (DHAR) 活性检测试剂盒

### Dehydroascorbate Reductase (DHAR) Activity Assay Kit

#### 一、产品描述

脱氢抗坏血酸还原酶 (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, 脱氢抗坏血酸还原酶在维持植物体内抗坏血酸的正常代谢水平, 保护细胞组分和抵御氧化损伤方面发挥着重要作用。

脱氢抗坏血酸还原酶催化还原性谷胱甘肽 (GSH) 还原脱氢抗坏血酸 (DHA) 生成抗坏血酸 (AsA), 还原性谷胱甘肽能够与 5,5'-二硫代-双-(2-硝基苯甲酸) (DTNB) 反应生成 2-硝基-5-巯基苯甲酸 (TNB) 和谷胱甘肽二硫化物 (GSSG), TNB 在 412 nm 处具有特征吸收峰, 通过测定还原性谷胱甘肽的减少速率即可表征脱氢抗坏血酸还原酶的活性。

#### 二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 110 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	粉剂×1 瓶	-20°C 保存	使用前加入 3 mL 蒸馏水充分溶解 (配置后-20°C分装可保存 2 周)
试剂三	粉剂×1 瓶	4°C 保存	使用前加入 3.5 mL 蒸馏水充分溶解
试剂四	液体 8 mL×1 瓶	4°C 保存	-
标准品	粉剂×1 支 (10 mg TNB)	4°C 保存	使用前加入 1 mL 蒸馏水充分溶解 (即为 10 mg/mL TNB 标准液)
标准稀释液的制备: 将 10 mg/mL TNB 标准液使用蒸馏水稀释至 0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.015625 mg/mL 即为标准稀释液。			

序号	1	2	3	4	5	6
稀释前浓度 (mg/mL)	10	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125
标准液体积 (μL)	50	500	500	500	500	500
蒸馏水体积 (μL)	950	500	500	500	500	500
稀释后浓度 (mg/mL)	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125	0.015625

### 三、产品使用说明

**测定过程中所需要的仪器和试剂：**可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿（光径 10 mm）/96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴和蒸馏水。

#### 1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：（5-10）的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量（ $10^4$  个）：提取液体积（mL）为（500-1000）：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率 300 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 3 min），4℃ 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

③血清、培养液等液体样本：直接检测或适当稀释后再进行检测。

#### 2.测定步骤

①分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 412 nm，蒸馏水调零。

②在离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定管 ( $\mu\text{L}$ )	对照管 ( $\mu\text{L}$ )	空白管 ( $\mu\text{L}$ )	空白对照管 ( $\mu\text{L}$ )	标准管 ( $\mu\text{L}$ )	标准空白管 ( $\mu\text{L}$ )
粗酶液	20	20	-	-	-	-
标准稀释液	-	-	-	-	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

充分混匀，25℃恒温显色 20 min

**吸光值测定：**吸取 200  $\mu\text{L}$  反应液至 96 孔板或微量石英比色皿中，测定 412 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 空白、A 空白对照、A 标准和 A 标准空白；计算  $\Delta A$  测定 = (A 空白 - A 空白对照) - (A 测定 - A 对照)， $\Delta A$  标准 = A 标准 - A 标准空白。注：空白管、空白对照管、标准空白管只需测定 1-2 次。

**标准曲线的建立：**以 0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.015625 mg/mL 为横坐标 (x)，以其对应的  $\Delta A$  标准为纵坐标 (y)，得到标准方程  $y=kx+b$ ，将  $\Delta A$  测定带入公式中得到 x (mg/mL)。

### 3. 脱氢抗坏血酸还原酶 (DHAR) 活性计算

#### ① 按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化 1 μg GSH 氧化所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{DHAR (U/mg prot)} = \frac{x \times V_{\text{提}} \times 10^3}{V_{\text{提}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{50 \times x}{\text{Cpr}}$$

#### ② 按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟催化 1 μg GSH 氧化所需酶量定义为一个酶活力单位。

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

#### ③ 按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10<sup>4</sup> 个细菌或细胞每分钟催化 1 μg GSH 氧化所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{DHAR (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{x \times V_{\text{提}} \times 10^3}{\text{细菌或细胞数量} \times T} = \frac{50 \times x}{\text{细菌或细胞数量}}$$

#### ④ 按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 样品每分钟催化 1 μg GSH 氧化所需酶量定义为一个酶活力单位。

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

**注释：** V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.02 mL；V 提：粗酶液总体积，1 mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计；10<sup>3</sup>：单位换算系数，1 mg=10<sup>3</sup> μg；T：反应时间：20 min。

### 四、注意事项

为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

**For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.**

**boxbio**

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

Liaodong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

