

脱氢抗坏血酸还原酶（DHAR）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号: BC0665

规格: 100T/48S

产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

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

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 3 mL 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 3.5 mL 蒸馏水充分溶解，2-8℃保存。
- 3、标准品：临用前加入 1 mL 蒸馏水，配制成 10 mg/mL 的标准溶液。

产品说明：

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 412 nm 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。

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、样本处理（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 1 mL），冰上充分研磨匀浆，8000 g，4℃，离心 10 min，取上清液置于冰上待测。
2. 细菌、细胞：按照细胞数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为 500-1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1





mL 提取液), 冰浴超声破碎细胞 (功率 300w, 超声 3s, 间隔 7s, 总时间 3 min) 然后 8000 g, 4°C, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

3. 血清等液体: 直接检测。

二、测定步骤

1、分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长到 412nm, 分光光度计蒸馏水调零。

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	标准空白管
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°C 放置 20 min 后测定各管 412 nm 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。

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

(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。

DHAR 活性 (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 10^4 个细胞 (细菌) 每分钟催化 1μg GSH 氧化为 1 个酶活力单位。

DHAR 活性 (U/ 10^4 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。

DHAR 活性 (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; 10^3 : 单位换算系数, 1mg = 10^3 μg; 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。



实验实例:

1、取 0.1g 商陆加入 1mL 提取液冰上充分研磨匀浆, 8000 g, 4°C 离心 10 min, 取上清液置于冰上, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A = (A_{\text{空白管}} - A_{\text{空白对照管}}) - (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) = (1.169 - 0.088) - (0.974 - 0.357) = 0.464$, 标准曲线 $y = 3.2972x + 0.0011$, 依据标准曲线计算 $x = 0.1404 \text{ mg/mL}$, 按样本质量计算酶活得: DHAR 活性(U/g 质量) $= 50x \div W = 70.2 \text{ U/g 质量}$ 。

相关发表文献:

[1] Liu N, Li J, Lv J, Yu J, Xie J, Wu Y, Tang Z. Melatonin alleviates imidacloprid phytotoxicity to cucumber (*Cucumis sativus* L.) through modulating redox homeostasis in plants and promoting its metabolism by enhancing glutathione dependent detoxification. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021 Jul 1;217:112248. doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112248. Epub 2021 Apr 23. PMID: 33901782.

[2] Zou Y, Cao S, Zhao B, Sun Z, Liu L, Ji M. Increase in glutathione S-transferase activity and antioxidant damage ability drive resistance to bensulfuron-methyl in *Sagittaria trifolia*. *Plant Physiol Biochem.* 2022 Nov 1;190:240-247. doi: 10.1016/j.plaphy.2022.09.007. Epub 2022 Sep 15. PMID: 36148723.

[3] Gao F, Shi Y, Wang R, Tretyakova IN, Nosov AM, Shen H, Yang L. Exogenous Glutathione Promotes the Proliferation of *Pinus koraiensis* Embryonic Cells and the Synthesis of Glutathione and Ascorbic Acid. *Plants (Basel).* 2022 Sep 30;11(19):2586. doi: 10.3390/plants11192586. PMID: 36235452; PMCID: PMC9571378.

[4] Tai F, Wang S, Liang B, Li Y, Wu J, Fan C, Hu X, Wang H, He R, Wang W. Quaternary ammonium iminofullerenes improve root growth of oxidative-stress maize through ASA-GSH cycle modulating redox homeostasis of roots and ROS-mediated root-hair elongation. *J Nanobiotechnology.* 2022 Jan 4;20(1):15. doi: 10.1186/s12951-021-01222-7. PMID: 34983547; PMCID: PMC8725307.

[5] Xie P, Yang Y, Gong D, Yu L, Han Y, Zong Y, Li Y, Prusky D, Bi Y. Chitooligosaccharide Maintained Cell Membrane Integrity by Regulating Reactive Oxygen Species Homeostasis at Wounds of Potato Tubers during Healing. *Antioxidants (Basel).* 2022 Sep 10;11(9):1791. doi: 10.3390/antiox11091791. PMID: 36139864; PMCID: PMC9495885.

相关系列产品:

- BC0650/BC0655 单脱氢抗坏血酸还原酶 (MDHAR) 活性检测试剂盒
- BC1230/BC1235 抗坏血酸 (AsA) 含量检测试剂盒
- BC1240/BC1245 脱氢抗坏血酸 (DHA) 含量检测试剂盒

