

CheKine™ 脱氢抗坏血酸还原酶 (DHAR) 活性检测试剂盒 (微量法)

货号: KTB3094

规格: 48 T/48 S

96 T/96 S

批号: 见产品标签

	适用样本: 植物组织、细胞或细菌、血清 (浆)
	保质期: 4℃, 避光保存 6 个月

01 背景与原理

脱氢抗坏血酸还原酶 (Dehydroascorbate reductase, DHAR) (EC 1.8.5.1) 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, 在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

本试剂盒检测原理是 DHAR 能够催化谷胱甘肽 (GSH) 还原脱氢抗坏血酸 (DHA), 从而生成还原型抗坏血酸 (AsA), 通过测定反应体系中 AsA 在特定波长下的吸光度上升速率, 即可计算出 DHAR 的酶活性水平。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Reagent I	60 mL	120 mL	4℃, 避光保存
Reagent II	8.75 mL	17.5 mL	4℃
Reagent III	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃, 避光保存
Reagent IV	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃, 避光保存

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10% 的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 265 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	UV 板
试剂	去离子水/PBS	试剂稀释用/样本清洗用
其他	匀浆器（组织样本）、水浴锅、低温离心机、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Reagent I	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Reagent II	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Working Reagent III	临用前配制；48 T 加入 1.25 mL 去离子水，96 T 加入 2.5 mL 去离子水，充分溶解	用不完的试剂 4℃避光保存 3 天
Working Reagent IV	临用前配制；48 T 加入 1.25 mL 去离子水，96 T 加入 2.5 mL 去离子水，充分溶解	用不完的试剂 4℃避光保存 3 天

05-2 样本制备

注意：建议使用新鲜样本。如果不立即使用，可将样品在-80℃下保存一个月。测定时，应控制解冻的温度和时间。室温环境下解冻时，需在 4 h 内完成样品解冻。

- 植物组织：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL Reagent I，冰浴匀浆，8000 g，4℃离心 10 min，取上清置冰上待测。
- 细胞或细菌：收集 5×10⁶ 个细胞或细菌，用预冷的 PBS 清洗细胞或细菌，800 g 离心 2 min，弃上清。加入 1 mL Reagent I 进行冰浴超声破碎。超声波破碎 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），4℃，8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。
- 血清（浆）等液体样本：直接测定。

05-3 实验步骤

- 1. 酶标仪准备：预热 30 min 以上，调节波长到 265 nm。
- 2. 检测体系配制：将 Reagent II 置于 25℃水浴预热 30 min。在 96 孔 UV 板中按照如下方式依次操作：

试剂	测定孔 (μL)
Working Reagent III	20
Working Reagent IV	20
Reagent II	140
样本	20

- 3. 吸光度检测：迅速混匀后于 265 nm 检测，记录 20 s 和 2 min 20 s 的吸光值，分别记为 A₁ 和 A₂。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn) > 进入“技术中心”> 查找“在线计算器”工具。



06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算 $\Delta A=A_2-A_1$

2. 样本 DHAR 活性计算

- 按样本蛋白浓度计算：

酶活单位定义：25℃中每毫克蛋白每分钟还原生成 1 nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$DHAR(U/mg\ prot)=\Delta A\div(\epsilon\times d)\times V_{反总}\times 10^9\div(Cpr\times V_{样})\div T=184\times\Delta A\div Cpr$

- 按样本鲜重计算：

酶活单位定义：25℃中每克样本每分钟还原生成 1 nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$DHAR(U/g)=\Delta A\div(\epsilon\times d)\times V_{反总}\times 10^9\div(W\times V_{样}\div V_{样总})\div T=184\times\Delta A\div W$

- 按细菌或细胞数量计算：

酶活单位定义：25℃中每 10⁴ 细菌或细胞每分钟还原生成 1 nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$DHAR(U/10^4)=\Delta A\div(\epsilon\times d)\times V_{反总}\times 10^9\div(N\times V_{样}\div V_{样总})\div T=184\times\Delta A\div N$

- 按液体体积计算：

酶活单位定义：25℃中每毫升液体每分钟还原生成 1 nmol AsA 为 1 个酶活单位。

$DHAR(U/mL)=\Delta A\div(\epsilon\times d)\times V_{反总}\times 10^9\div V_{样}\div T=184\times\Delta A$

ε：AsA 在 265 nm 处摩尔吸光系数，5.42×10⁴ L/mol /cm；10⁹：换算系数，1 mol=10⁹ nmol；d：96 孔板光径，0.5 cm；V_{反总}：反应体系总体积，2×10⁻⁴ L；V_样：反应体系中加入上清液体积，0.02 mL；V_{样总}：Reagent I 体积，1 mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样品质量，g；T：反应时间，2 min；N：细胞或细菌数量，以 10⁴ 为单位（例如细胞数量为 5×10⁶，N=500）。

07 结果展示

示例-1: 称取 0.109 g 绿萝叶按照测定步骤操作, 用 96 孔 UV 板测得: $A_1=0.348$, $A_2=0.431$, $\Delta A=A_2-A_1=0.083$, 按样本质量计算酶活得: $DHAR(U/g)=184\times\Delta A\div W=140.11\text{ U/g}$ 。

示例-2: 称取 0.121 g 拟南芥叶片按照测定步骤操作, 用 96 孔 UV 板测得: $A_1=0.449$, $A_2=0.585$, $\Delta A=A_2-A_1=0.136$, 按样本质量计算酶活得: $DHAR(U/g)=184\times\Delta A\div W=206.81\text{ U/g}$ 。

08 FAQ

- 检测得到的样本 ΔA 过高或者过低怎么办?

如果 ΔA 小于 0.02 可适当加大样本量。如果 ΔA 大于 0.8, 样本可用 Reagent I 进一步稀释, 或减少提取用样本量, 再重新进行测定。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB3090	CheKine™ 脱氢抗坏血酸 (DHA) 含量检测试剂盒 (微量法)
KTB3091	CheKine™ 抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 活性检测试剂盒 (微量法)
KTB3093	CheKine™ 抗坏血酸氧化酶 (AAO) 活性检测试剂盒 (微量法)

CheKine™ 脱氢抗坏血酸还原酶 (DHAR) 检测流程示意图

(Abbkin 货号：KTB3094)

