

## 脱氢抗坏血酸(DHA)含量检测试剂盒说明书

### Dehydroascorbic Acid Assay Kit

微量法

货号: AK325

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK325-A	100mL×1 瓶	室温保存;
AK325-B	16mL×1 瓶	室温保存;
AK325-C	粉剂×1 瓶	4℃保存。临用前加入 5mL 蒸馏水充分溶解。
AK325-D	粉剂×1 瓶	4℃保存。临用前加入 5.743 mL 蒸馏水充分溶解; 吸取 0.1 mL 上述 溶液, 加入 0.9 mL 蒸馏水, 混匀, 即为 100μmol/L DHA。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 脱氢抗坏血酸 (Dehydroascorbic Acid, DHA) 是氧化形式的抗坏血酸 (维生素 C, Ascorbic Acid, AsA)。AsA 作为植物细胞一个重要生理指标, 其 AsA 的含量、氧化还原状态 (AsA/DHA 比率) 及其合成与代谢相关酶类活性的变化涉及植物对一系列环境胁迫的响应。DHA 是 AsA 的可逆的氧化型, 在生物体内, 与抗坏血酸共同组成氧化还原系统, 具有电子受体的作用。

原理: DTT 还原 DHA 生成 AsA, 通过测定体系中 AsA 的生成速率, 即可计算出 DHA 含量。

自备用品:

可见分光光度计、微量石英比色皿、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、蒸馏水。

样品中 DHA 提取:

1. 组织样本:

组织: 按照组织质量 (g): AK325-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK325-A) 进行冰浴匀浆。12000g, 4℃离心 20min, 取上清置冰上待测。

2. 细菌、真菌样本:

细菌、真菌: 按照细胞数量 ( $10^4$  个): AK325-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL AK325-A), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 12000g, 4℃离心 10min, 取上清液置于冰上待测。

3. 液体样本: 直接测定。

测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min, 调节波长到 265 nm, 蒸馏水调零。
2. AK325-B 在 25℃水浴锅中预热 30 min。
3. 在微量石英比色皿/96 孔板中依次加入

试剂名称	标准管 (ul)	测定管 (ul)
标准液	20	
AK325-B	160	
AK325-C	20	

迅速混匀后于 265nm 比色, 记录 10s 和 130s 的吸光值 A1 和 A2, $\Delta A$ 空白管=A2-A1。		
上清液		20
AK325-B		160
AK325-C		20
迅速混匀后于 265nm 比色, 记录 10s 和 130s 的吸光值 A3 和 A4, $\Delta A$ 测定管=A4-A3。		

注意: 标准管只需测定一次。

#### DHAR 活性计算公式:

##### a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

###### 1. 按样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{DHA (nmol/mg prot)} &= [\text{C 标准液} \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \times V \text{ 标准}] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \\ &= 100 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

###### 2. 按样本鲜重计算

$$\begin{aligned} \text{DHA (nmol/g)} &= [\text{C 标准液} \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \times V \text{ 标准}] \div (\text{W} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \\ &= 100 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \div \text{W} \end{aligned}$$

###### 3. 按细菌或细胞密度计算

$$\begin{aligned} \text{DHA (nmol/10}^4 \text{ cell)} &= [\text{C 标准液} \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \times V \text{ 标准}] \div (\text{W} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \\ &= 100 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

###### 4. 按液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{DHA (nmol/mL)} &= [\text{C 标准液} \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \times V \text{ 标准}] \div V \text{ 样} \\ &= 100 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

注: C 标准液: 100 $\mu$ mol/L; V 样总: 上清液总体积, 1.0 mL=1 $\times$ 10<sup>-3</sup> L; Cpr: 上清液蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量 (g)。

##### b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

###### 1. 按蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{DHA (nmol/mg prot)} &= [\text{C 标准液} \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \times V \text{ 标准}] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \\ &= 100 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

###### 2. 按样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{DHA (nmol/g)} &= [\text{C 标准液} \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \times V \text{ 标准}] \div (\text{W} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \\ &= 100 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \div \text{W} \end{aligned}$$

###### 3. 按细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{DHA (nmol/10}^4 \text{ cell)} &= [\text{C 标准液} \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \times V \text{ 标准}] \div (\text{W} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \\ &= 100 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

###### 4. 按液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{DHA (nmol/mL)} &= [\text{C 标准液} \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \times V \text{ 标准}] \div V \text{ 样} \\ &= 100 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

注: C 标准液: 100 $\mu$ mol/L; V 样总: 上清液总体积, 1.0 mL=1 $\times$ 10<sup>-3</sup> L; Cpr: 上清液蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量 (g)。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司: BCA Protein Assay Kit (C05-02001)

#### 注意事项:

1. 临用前配制的试剂未使用完的4 $^{\circ}$ C保存, 3 天内使用完。
2. 最低检出限为 10 $\mu$ mol/L。