

脱氢抗坏血酸（DHA）含量检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

货号：AC10271

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 40 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	-20°C保存
标准品	粉剂×1 瓶	-20°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 5 mL 蒸馏水充分溶解。溶解后可分装保存于-20°C；
- 2、标准品：临用前加入 5.743 mL 蒸馏水充分溶解，即为 1 $\mu\text{mol/mL}$ DHA；再用蒸馏水稀释为 0.5 $\mu\text{mol/mL}$ DHA 备用。溶解后可分装保存于-20°C。

产品说明：

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。

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。

技术指标：

最低检出限：0.0065 $\mu\text{mol/mL}$ 线性范围：0.015625-1 $\mu\text{mol/mL}$

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：

低温离心机、紫外分光光度计、1mL石英比色皿、可调式移液器、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

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）

称取约0.1g样本，加提取液1mL，冰上充分研磨，16000g 4°C离心20min，取上清液待测。

二、测定步骤

- 1、分光光度计预热30min，调节波长到265nm，蒸馏水调零。
- 2、试剂一在25°C水浴锅中预热30min以上。
- 3、标准管：依次在1mL石英比色皿加入100 μL 标准液、800 μL 预热的试剂一和100 μL 试剂二，迅速混匀后于265nm 比色，记录10s和130s的吸光值，分别为A1、A2， ΔA 标准管=A2-A1。

4、测定管：依次在1mL石英比色皿加入100 μ L上清液、800 μ L预热的试剂一和100 μ L试剂二，迅速混匀后于265nm比色，记录10s和130s的吸光值，分别为A3、A4， ΔA 测定管=A4-A3。

三、样本中 DHA 含量计算

1、按蛋白浓度计算：

$$\text{DHA}(\mu\text{mol}/\text{mg prot}) = \text{C标准液} \times (\Delta A \text{测定管} \div \Delta A \text{标准管}) \div \text{Cpr} = 0.5 \times \Delta A \text{测定管} \div \Delta A \text{标准管} \div \text{Cpr}$$

2、按样本质量计算：

$$\text{DHA}(\mu\text{mol}/\text{g 质量}) = [\text{C标准液} \times (\Delta A \text{测定管} \div \Delta A \text{标准管}) \times \text{V样总}] \div \text{W} = 0.5 \times \Delta A \text{测定管} \div \Delta A \text{标准管} \div \text{W}$$

C标准液：DHA浓度，0.5 μ mol/mL；V样总：上清液总体积，1.0mL；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g。

注意事项：

正式实验前做1~2个预实验，如果 ΔA 大于0.5，建议将样本用提取液进行稀释后进行测定。

实验实例：

1、取 0.1g 红叶石楠加提取液 1mL，冰上充分研磨，16000g 4 $^{\circ}$ C离心 20min，取上清液稀释 4 倍后按照测定步骤操作，测得计算 ΔA 测定管=A4-A3=1.207-1.19=0.017， ΔA 标准管=A2-A1=0.295-0.043=0.252，按样本质量计算含量得：

$$\text{DHA}(\mu\text{mol}/\text{g 质量}) = 0.5 \times \Delta A \text{测定管} \div \Delta A \text{标准管} \div \text{W} \times 4 \text{ (稀释倍数)} = 1.349 \mu\text{mol}/\text{g 质量}。$$