

# 单脱氢抗坏血酸还原酶（monodehydroascorbate reductase, MDHAR）试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

## 测定意义：

MDHAR 催化 MDHA 还原生成 AsA，在抗坏血酸氧化还原代谢中具有重要作用。

## 测定原理：

MDHAR 催化 NADH 还原 MDHA 生成 AsA 和 NAD<sup>+</sup>，NADH 在 340 nm 有特征吸收峰，但是 NAD<sup>+</sup> 没有。通过测定 340 nm 光吸收下降速率，来计算出 MDHAR 活性。

## 组成：

| 产品名称   | VC011-50T/48S | Storage |
|--------|---------------|---------|
| 试剂一：液体 | 50ml          | 4°C     |
| 试剂二：液体 | 50ml          | 室温      |
| 试剂三：粉剂 | 1 瓶           | 4°C     |
| 试剂四：粉剂 | 1 瓶           | 4°C     |
| 试剂五：液体 | 25μl          | 4°C     |
| 说明书    | 一份            |         |

试剂三：粉剂×1 瓶（棕色），4°C 保存。临用前加入 5ml 蒸馏水充分溶解。

试剂四：粉剂×1 瓶，4°C 保存。临用前加入 5ml 蒸馏水充分溶解。

试剂五：液体 25μl×1 瓶，4°C 保存。临用前加 5ml 试剂二充分溶解。

## 自备仪器和用品：

研钵、冰、台式离心机、紫外分光光度计、1ml 石英比色皿、可调式移液枪和双蒸水

## 粗酶液提取：

1. 组织：按照组织质量（g）：试剂一体积（ml）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1ml 试剂一）进行冰浴匀浆。8000g，4°C 离心 10min，取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（10<sup>4</sup> 个）：试剂一体积（ml）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1ml 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；8000g，

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



4°C离心 20min, 取上清液置冰上混匀待测。

3. 血清等液体: 直接测定。

### MDHAR 测定操作:

1. 分光光度计预热 30 min, 调节波长到 340 nm, 蒸馏水调零。
2. 试剂二在 25°C水浴锅中预热 30 min。
3. 依次在比色皿中加入 100μl 试剂三、100μl 试剂四、100μl 试剂五和 600μl 试剂二, **最后加入 100μl 上清液**, 迅速混匀后于 340nm 比色, 记录 30s 和 150s 的吸光值 A1 和 A2,  $\Delta A=A1-A2$ 。

### MDHAR 活性计算公式:

(1). 按蛋白浓度计算

MDHAR 活性单位定义: 25°C中每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{MDHAR (nmol/min /mg prot)} = \frac{\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{(C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T} \\ = 804 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2). 按样本质量计算

MDHAR 活性单位定义: 25°C中每克样本每分钟氧化 1nmol NADH 为 1U。

$$\text{MDHAR (nmol/min /g 鲜重)} = \frac{\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{(W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T} \\ = 804 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细胞数量计算

MDHAR 活性单位定义: 25°C中每 10<sup>4</sup>个细胞每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{MDHAR (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{(\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T} \\ = 804 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算

MDHAR 活性单位定义: 25°C中每毫升液体每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{MDHAR (nmol/min /ml)} = \frac{\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{V_{\text{样}} \div T} \\ = 804 \times \Delta A$$

$\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数, 6220 L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应体系总体积, 1ml=0.001 L, V 样: 加入反应体系中上清液体积, 100μl=0.1ml; Cpr: 上清液蛋白浓度, mg/ml, 蛋白质浓度需要另外测定, 建议使用本公司蛋白质含量 BCA 试剂盒; V 样总: 加入提取液体积, 1ml; W, 样本质量, g; T: 反应时间, 2min。

### 注意事项:

临用前配制的试剂未使用完的 4°C保存, 3 天内使用完。

