



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

单脱氢抗坏血酸还原酶(MDHAR)活性检测试剂盒 (微量法)

货号: R41942

规格: 100T/96S

有效期: 6个月

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
试剂-A	100mL×1瓶	2-8℃保存;
试剂-B	20mL×1瓶	室温保存; 临用前在25℃水浴锅中预热30 min。
试剂-C	粉剂×1瓶(棕色)	2-8℃保存; 临用前加入3mL蒸馏水充分溶解。
试剂-D	粉剂×1瓶	2-8℃保存; 临用前加入2.5mL蒸馏水充分溶解。
试剂-E	粉剂×1瓶	2-8℃保存。临用前加3mL试剂-B充分溶解。

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: 单脱氢抗坏血酸还原酶 (monodehydroascorbate reductase, MDHAR) 催化 MDHA 还原生成抗坏血酸 (AsA), 在抗坏血酸氧化还原代谢中具有重要作用。

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

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、研钵、冰、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板和双蒸水。

样品处理:

1. 组织样品的制备:



组织: 按照组织质量 (g): 试剂-A 体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂-A) 进行冰浴匀浆。8000g, 4℃离心 10min, 取上清置冰上待测。

2. 细菌、细胞样品的制备:

细菌、真菌: 按照细胞数量 (10^4 个): 试剂-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500万细胞加入 1mL 试剂-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); 8000g, 4℃离心 20min, 取上清液置冰上混匀待测。

3. 血清等液体样本: 直接测定。

测定步骤:

1. 可见分光光度计/酶标仪预热 30 min, 调节波长到 340 nm, 蒸馏水调零。
2. 试剂-B 在 25℃水浴锅中预热 30 min。
3. 依次在微量石英比色皿/96 孔板中按顺序加入下列试剂:

试剂名称	测定管(uL)
试剂-C	20
试剂-D	20
试剂-E	20
试剂-B	120
样本	20

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:

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按照样本蛋白浓度计算

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

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

2. 按照样本重量计算



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

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

3. 按照细胞数量计算

MDHAR 活性单位定义: 25°C中每 10⁴ 个细胞每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

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

4. 按照液体体积计算

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。

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

注: ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6220 L/mol/cm; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.2mL=2×10⁻⁴L; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积, 20μL=0.02mL; $V_{\text{样总}}$: 试剂-A 体积, 1 mL; C_{pr} : 上清液蛋白浓度, mg/mL, W : 样品质量; T : 反应时间, 2min。

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下:

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。

$$\text{MDHAR (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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 1 个酶活单位。

$$\text{MDHAR (nmol/min /g)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div W$$



3. 按细胞数量计算

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

$$\text{MDHAR (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \div (\epsilon \div d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

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。

$$\text{MDHAR (nmol/min /mL)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1608 \times \Delta A$$

注: ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6220 L/mol/cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.2mL= 2×10^{-4} L; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积, 20 μ L=0.02mL; $V_{\text{样总}}$: 试剂-A 体积, 1 mL; Cpr: 上清液蛋白浓度, mg/mL, W: 样品质量; T: 反应时间, 2min。

注意事项:

临用前配制的试剂未使用完的 2-8°C 保存, 3 天内使用完。

源叶