

单脱氢抗坏血酸还原酶（MDHAR）活性测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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^+ ，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。

实验中所需仪器及设备：

研钵、冰、台式离心机、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、可调式移液枪和双蒸水

试剂组成和配置：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 20mL×1 瓶，室温保存。

试剂三：粉剂×1 瓶（棕色），4℃ 保存。临用前加入 3 mL 蒸馏水充分溶解。

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加入 2.5 mL 蒸馏水充分溶解。

试剂五：液体 15 μL ×1 瓶，4℃ 保存。临用前加 3 mL 试剂二充分溶解。

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℃ 离心 10min，取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（ 10^4 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，4℃ 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/酶标仪预热 30 min，调节波长到 340 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂二在 25℃ 水浴锅中预热 30 min。
3. 依次在微量石英比色皿/96 孔板中加入 20 μL 试剂三、20 μL 试剂四、20 μL 试剂五和 120 μL 试剂二，最后加入 20 μL 上清液，迅速混匀后于 340nm 比色，记录 30s 和 150s 的吸光值 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。

$$\begin{aligned}\text{MDHAR (nmol/min /mg prot)} &= \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 804 \times \Delta A \div Cpr\end{aligned}$$

(2). 按样本质量计算

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

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

(3) 按细胞数量计算

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

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

(4) 按液体体积计算

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

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

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; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1 mL; 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; 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℃中每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{MDHAR (nmol/min /mg prot)} &= \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 1608 \times \Delta A \div Cpr\end{aligned}$$

(2). 按样本质量计算

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

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

(3) 按细胞数量计算

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

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

(4) 按液体体积计算

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

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

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=2×10⁻⁴L; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积, 20μL=0.02mL; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1 mL; 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; 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 4℃ 保存，3 天内使用完。