

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

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、1mL 石英比色皿、可调式移液枪和双蒸水

试剂组成和配置：

试剂一：液体 50mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：液体 50mL×1 瓶，室温保存。

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

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃保存。临用前加入 5mL 蒸馏水充分溶解。

试剂五：液体 25 μL×1 瓶，4℃保存。临用前加 5mL 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（10⁴ 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℃中每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

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

$$= 804 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

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

$$= 804 \times \Delta A \div W$$

(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。

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

$$= 804 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

(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。

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

$$= 804 \times \Delta A$$

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, 1mL=0.001 L, $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积, 100 μ L=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; $V_{\text{样总}}$: 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℃保存, 3 天内使用完。