

## 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<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。

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15μL×1瓶，4℃保存。临用前加3 mL试剂二充分溶解。

粗酶液提取：

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。

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，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20μL试剂三、20μL试剂四、20μL试剂五和120μL试剂二，最后加入20μL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：

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。

$MDHAR (nmol/min / mg prot) = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{反总} \times 109 \div (C_{pr} \times V_{样}) \div T$

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

(2). 按样本质量计算

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

$$\text{MDHAR (nmol/min /g 鲜重)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

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

(3) 按细胞数量计算

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

$$\text{MDHAR (nmol/min/104 cell)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109 \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

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

(4) 按液体体积计算

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

$$\text{MDHAR (nmol/min /mL)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109 \div V_{\text{样}} \div T$$

$$= 804 \times \Delta A$$

$\epsilon$ : NADH摩尔消光系数, 6220 L/mol/cm;  $d$ : 比色皿光径, 1cm;  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积, 0.2mL=2×10<sup>-4</sup>L;  $V_{\text{样}}$ : 加入反应体系中上清液体积, 20 $\mu$ L=0.02mL;  $V_{\text{样总}}$ : 提取液体积, 1 mL;  $\text{Cpr}$ : 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°C中每毫克蛋白每分钟氧化1nmol NADH 为1个酶活单位。

$$\text{MDHAR (nmol/min /mg prot)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109 \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T$$

$$= 1608 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{MDHAR (nmol/min /g 鲜重)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 1608 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细胞数量计算

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

$$\text{MDHAR (nmol/min/104 cell)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109 \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 1608 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

(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。

$$\text{MDHAR (nmol/min /mL)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 109 \div V_{\text{样}} \div T$$

$$= 1608 \times \Delta A$$

$\epsilon$ : NADH摩尔消光系数, 6220 L/mol/cm;  $d$ : 96孔板光径, 0.5cm;  $V_{反总}$ : 反应体系总体积,  $0.2\text{mL}=2\times 10^{-4}\text{L}$ ;  $V_{样}$ : 加入反应体系中上清液体积,  $20\mu\text{L}=0.02\text{mL}$ ;  $V_{样总}$ : 提取液体积, 1 mL;  $C_{pr}$ : 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°C保存, 3天内使用完。

---

[www.affandi-e.com](http://www.affandi-e.com)