

# 单脱氢抗坏血酸还原酶 (MDHAR) 活性检测试剂盒 (微量法)

注意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

产品货号：BA1080

产品规格：100管/96样

## 产品简介：

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。

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。

## 产品内容：

提取液：液体110mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：液体15mL×1瓶，4℃保存。

试剂二：粉剂×1瓶，4℃避光保存。临用前加入2 mL蒸馏水充分溶解。

试剂三：粉剂×1瓶，-20℃避光保存。临用前加入2.5 mL蒸馏水充分溶解。

试剂四：液体×1瓶，-20℃避光保存。临用前加2mL试剂一充分溶解。

## 需自备的仪器和用品：

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UV板、可调式移液枪和双蒸水

## 操作步骤：

### 一、粗酶液提取：

1、组织：按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 1：5-10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液进行冰浴匀浆。10000rpm，4℃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)：提取液体积 (mL) 为500-1000：1的比例（建议500万细胞加入1mL提取液），冰浴超声超声破碎细胞（功率300w，超声3s，间隔7s，总时间3min）；然后10000rpm，4℃，离心10min，取上清置于冰上待测。

### 二、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. 试剂一在25℃水浴锅中预热30 min。

3. 依次在微量石英比色皿/96孔UV板中加入下列试剂

试剂名称 (μL)	试剂二	试剂三	试剂四	试剂一	蒸馏水	上清液
空白管	20	20	20	120	20	
测定管						20

迅速混匀后于340nm比色，记录30s和150s的吸光值,分别记为A1、A2， $\Delta A=A1-A2$ ，得到 $\Delta A$ 测定， $\Delta A$ 空白。

### 三、MDHAR 活性计算：

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



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

MDHAR活性单位定义：25℃中每毫克蛋白每分钟氧化1 $\mu$ mol NADH为1U。

$$\text{MDHAR (U/mg prot)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ = 0.804 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

MDHAR 活性单位定义：25℃中每克样品每分钟氧化1 $\mu$ mol NADH为1U。

$$\text{MDHAR (U/g 鲜重)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ = 0.804 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

MDHAR 活性单位定义：25℃中每10<sup>4</sup>个细胞每分钟氧化1 $\mu$ mol NADH为1U。

$$\text{MDHAR (U/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 0.804 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{细胞数量}$$

$\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数, 6220L/mol/cm;  $d$ : 比色皿光径, 1cm;  $10^6$ : 1mol=1 $\times 10^6$  $\mu$ mol;  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积, 0.2mL=2 $\times 10^{-4}$ 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, g;  $T$ : 反应时间, 2min; 细胞数量: 万个。

**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1 $\mu$ mol NADH为1U。

$$\text{MDHAR (U/mg prot)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ = 1.340 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

MDHAR 活性单位定义：25℃中每克样品每分钟氧化1 $\mu$ mol NADH为1U。

$$\text{MDHAR (U/g 鲜重)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ = 1.340 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

MDHAR 活性单位定义：25℃中每10<sup>4</sup>个细胞每分钟氧化1 $\mu$ mol NADH为1U。

$$\text{MDHAR (U/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 1.340 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{细胞数量}$$

$\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数, 6220 L/mol/cm;  $d$ : 96孔板光径, 0.6cm;  $10^6$ : 1mol=1 $\times 10^6$  $\mu$ mol;  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积, 0.2mL=2 $\times 10^{-4}$ 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, g;  $T$ : 反应时间, 2min; 细胞数量: 万个。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com