

# 单脱氢抗坏血酸还原酶（MDHAR）活性检测试剂盒 （紫外分光光度法）

产品货号：BA1079

产品规格：50管/48样

## 产品说明：

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340nm有特征吸收峰，但是NAD<sup>+</sup>没有。通过测定340nm光吸收下降速率，来计算出MDHAR活性。

**注意：**实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

## 产品内容：

| 试剂名称 | 规格        | 保存条件 |
|------|-----------|------|
| 提取液  | 液体60mL×1瓶 | 4℃   |
| 试剂一  | 液体30mL×1瓶 | 4℃   |
| 试剂二  | 粉剂×1瓶     | 4℃   |
| 试剂三  | 粉剂×1瓶     | -20℃ |
| 试剂四  | 液体×1瓶     | -20℃ |

## 溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入5mL蒸馏水充分溶解，4℃保存；
2. 试剂三：临用前加入5mL蒸馏水充分溶解，可溶解后分装-20℃保存，避免反复冻融；
3. 试剂四：液体置于试剂瓶内EP管中。临用前加5mL 试剂一充分溶解，可溶解后分装-20℃保存，避免反复冻融。

## 需自备的仪器和用品：

研钵/匀浆器、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。

## 操作步骤：

### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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、细胞：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、测定步骤

1. 分光光度计预热30min，调节波长到340nm，蒸馏水调零。
2. 试剂一在25℃水浴锅中预热30min。
3. 依次在石英比色皿中加入下列试剂



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

| 试剂名称 (μL) | 空白管 | 测定管 |
|-----------|-----|-----|
| 试剂二       | 100 | 100 |
| 试剂三       | 100 | 100 |
| 试剂四       | 100 | 100 |
| 试剂一       | 400 | 400 |
| 蒸馏水       | 300 |     |
| 上清液       |     | 300 |

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 $\Delta A$ 测定管、 $\Delta A$ 空白管。

### 三、MDHAR活性计算：

#### 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1μmol NADH为一个酶活单位。

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

$$= 0.268 \times (\Delta A \text{测定管} - \Delta A \text{空白管}) \div \text{Cpr}$$

#### 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1μmol NADH为一个酶活单位。

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

$$= 0.268 \times (\Delta A \text{测定管} - \Delta A \text{空白管}) \div W$$

#### 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1μmol NADH为一个酶活单位。

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

$$= 0.268 \times (\Delta A \text{测定管} - \Delta A \text{空白管}) \div \text{细胞数量}$$

$\epsilon$ : NADH摩尔消光系数, 6220 L/mol/cm;  $d$ : 比色皿光径, 1cm;  $10^6$ : 单位换算系数,  $1\text{mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$ ;  $V$ 反总: 反应体系总体积,  $1\text{mL} = 0.001\text{L}$ ;  $V$ 样: 加入反应体系中上清液体积,  $300\mu\text{L} = 0.3\text{mL}$ ;  $V$ 样总: 提取液体积,  $1\text{mL}$ ;  $\text{Cpr}$ : 上清液蛋白浓度,  $\text{mg/mL}$ , 蛋白质浓度需要另外测定;  $W$ : 样本质量,  $\text{g}$ ; 细胞数量: 以 $10^4$ 为单位计量, 万个;  $T$ : 反应时间,  $2\text{min}$ 。

### 注意事项:

1. 当 $\Delta A$ 测定大于0.3时，建议客户稀释样本或者调整试剂一和上清液的比例（如将400μL试剂一+300μL上清液改为 600μL试剂一+100μL上清液）后进行测定。
2. 当 $\Delta A$ 测定过小时，建议客户提高样本量或者调整试剂一和上清液的比例（如将400μL试剂一+300μL上清液改为 200μL试剂一+500μL上清液）。
3. 当A1大于1.5时，建议将样本稀释进行测定。
4. 空白管为检测各管试剂组份的检测孔，正常情况下，其OD值在0.5左右，变化不超过0.01。
5. 由于提取液中含有一定浓度的蛋白（约1mg/mL），所以在测定样品蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白含量。



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