

单脱氢抗坏血酸还原酶 (MDHAR) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-FM013 微板法 96 样)

一、产品简介:

单脱氢抗坏血酸还原酶 (MDHAR, EC 1.6.5.4) 是使抗坏血酸 (AsA) 再生的关键酶之一, 催化 MDHA 重新还原成 AsA, 对于维持抗坏血酸的抗氧化特性具有重要作用。

MDHAR 催化 NADH 还原 MDHA 生成 AsA 和 NAD⁺, 通过测定 NADH 在 340 nm 处的光吸收下降速率, 来计算出 MDHAR 活性。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 4 支	-20°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部, 每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解, 用不完的试剂分装后-20°C保存(可保存一个月), 禁止反复冻融, 解冻后可 4°C保存并一周内使用完。
试剂三	粉剂 3 支	4°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部, 再每支加 2mL 蒸馏水充分溶解, 用不完的试剂分装后-20°C保存(可保存一个月), 禁止反复冻融, 解冻后可 4°C保存并一周内使用完。
试剂四	液体 0.12mL×2 支	-20°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部, 可分装后-20°C保存, 禁止反复冻融。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板 (UV 板)、研钵、冰、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅。

四、单脱氢抗坏血酸还原酶 (MDHAR) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注意】若样本颜色较深 (如植物叶片), 可引起起始值 A1 值较大如超过 2, 可在样本制备过程中增加除色素步骤: 取约 0.2g 组织 (水分充足的样本可取 1g), 加入 90%乙醇冰浴匀浆, 12000rpm, 4°C离心 10min, 弃掉色素较深的上清液; 以上除色素步骤重复 2 次。最后向离心得到的沉淀中加入 1mL 提取液, 混匀或再次冰浴匀浆, 12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清置冰上待测。

② 液体样本: 直接测定。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 打开酶标仪, 设置温度 25°C, 调节波长到 340 nm。

② 试剂一在 25°C水浴锅中预热 30 min。

③ 在 96 孔 UV 板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
-----------	-----

样本	20
试剂一	138
试剂二	20
试剂三	20
试剂四	2
轻轻混匀，25°C条件下，于340nm处检测，分别于10s和5min10s读取吸光值A1和A2， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

- 【注】1.若 ΔA 值小于0.01，可适当延长反应时间T（如由5min10s延长到10min10s或更长时间读取A2）。或适当加大样本量V1（如由20 μ L增至40 μ L，则试剂一相应减少），则改变后的T和V1需代入公式重新计算。
- 2.若起始值A太大如超过2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值相对会偏高），可对叶片进行除色素处理（参考样本制备阶段注意事项）或适当减少样本加样量V1（如由20 μ L减至10 μ L，则试剂一相应增加），则改变后的V1需代入公式重新计算。
- 3.若下降趋势不稳定，可以每隔10S读取一次吸光值，选取一段线性下降的时间段来参与计算，相对应的A值也代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按蛋白浓度计算：

活性定义：在25°C反应条件下，每毫克蛋白每分钟氧化1nmol NADH为1个酶活单位。

$$\text{MDHAR (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T = 643.1 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本质量计算：

活性定义：在25°C反应条件下，每克样本每分钟氧化1nmol NADH为1个酶活单位。

$$\text{MDHAR (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div W$$

3、按液体体积计算：

活性定义：在25°C反应条件下，每毫升液体每分钟氧化1nmol NADH为1个酶活单位。

$$\text{MDHAR (nmol/min/mL)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 643.1 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数，6220 L/mol/cm；

d---96 孔板光径，0.5cm；

V---提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，20 μ L=0.02mL； V2---反

应体系总体积，200 μ L=2 $\times 10^{-4}$ L；

W---样品质量，g；

T---反应时间，5min；

Cpr---上清液蛋白浓度，mg/mL，建议使用本公司的BCA蛋白含量检测试剂盒。