

单脱氢抗坏血酸还原酶（MDHAR）试剂盒说明书

（货号：ADS-F-FM013 紫外法 48 样 有效期：6 个月）

一、指标简介：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 4 支	-20°C保存	每支： 1. 临用前 8000g 4°C离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 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)； 3. 禁止反复冻融，解冻后可 4°C存放并于一周内用完。
试剂三	粉剂 3 支	4°C保存	每支： 1. 临用前 8000g 4°C离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 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)； 3. 禁止反复冻融，解冻后可 4°C存放并于一周内用完。
试剂四	液体 0.22mL 2 支	-20°C保存	每支： 1. 临用前 8000g 4°C离心 2min 使试剂落入管底； 2. 分装后-20°C保存，禁止反复冻融（保存周期与试剂盒有效期相同）。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

① 动、植物组织样本：

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。

③ 细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，冰浴匀浆(可使用各类常见电动匀浆器)，12,000rpm 4°C 离心 10min，取上清待测。

2、检测步骤：

① 打开紫外分光光度计，设置温度 25°C（若仪器无法控温，则等待仪器过自检程序即可），调节波长到 340 nm。

② 试剂一在 25°C 水浴锅中预热 30 min。

③ 按照下表在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	80
试剂一	552
试剂二	40
试剂三	80
试剂四	8
混匀，25°C 条件下，于 340nm 处检测，分别读取 10s 和 5min10s 的吸光值，并记录为 A1 和 A2， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

- 【注】** 1. 若 ΔA 值小于 0.01，可延长反应时间 T（如由 5min10s 延长到 10min10s 或更长时间读取 A2）。也可适当加大样本量 V1（如由 80μL 增至 120μL，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 A1 太大，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 80μL 减至 40μL，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，相应的 A 值也代入计算公式重新计算。
4. 本指标可与我司 DHAR、GR、APX、AAO、GSH-Px、TrxR、TPX、SOD、CAT、POD、MDA、PPO、BCA 等指标共同提取，更多指标详询我司。

五、结果计算：

1、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。

$$\text{MDHAR (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 321.5 \times \Delta A \div W$$

2、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。

$$\text{MDHAR (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (Cpr \times V1) \div T = 321.5 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

$$\text{MDHAR (nmol/min/mL)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 321.5 \times \Delta A$$

4、按细菌/细胞数量计算：

活性定义：在 25°C 反应条件下，每 10⁴ 个细菌/细胞每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{MDHAR (nmol/min/mL)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.643 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数，6220 L/mol/cm；

d---96 孔板光径，1cm；

V---提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，80μL=0.08mL；

V2---反应体系总体积，800μL=8×10⁻⁴L；

500---细菌/细胞数量，万；

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。