

单脱氢抗坏血酸还原酶(MDHAR)活性检测试剂盒说明书

Monodehydroascorbate Reductase Assay Kit

微量法

货号: AK297

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK297-A	100mL×1 瓶	4℃保存
AK297-B	20mL×1 瓶	室温保存; 临用前在 25℃水浴锅中预热 30 min
AK297-C	粉剂×1 瓶	4℃避光保存; 临用前加入 3mL 蒸馏水充分溶解
AK297-D	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加入 2.5mL 蒸馏水充分溶解
AK297-E	粉剂×1 瓶	-20℃保存; 临用前加 3mL AK297-B 充分溶解

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 单脱氢抗坏血酸还原酶 (monodehydroascorbate reductase, MDHAR) 催化 MDHA 还原生成抗坏血酸 (AsA), 在抗坏血酸氧化还原代谢中具有重要作用。

原理: MDHAR 催化 NADH 还原 MDHA 生成 AsA 和 NAD⁺, NADH 在 340 nm 有特征吸收峰, 但是 NAD⁺没有。通过测定 340 nm 光吸收下降速率, 来计算出 MDHAR 活性。

自备用品:

紫外分光光度计/酶标仪、研钵、冰、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、冰和双蒸水。

样品处理:

1. 组织样品的制备:

组织: 按照组织质量 (g): AK297-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK297-A) 进行冰浴匀浆。8000g, 4℃离心 10min, 取上清置冰上待测。

2. 细菌、细胞样品的制备:

细菌、细胞: 按照细胞数量 (10⁴ 个): AK297-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL AK297-A), 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. 血清等液体样本: 直接测定。

测定步骤

1. 可见分光光度计/酶标仪预热 30 min, 调节波长到 340 nm, 蒸馏水调零。
2. AK297-B 在 25℃水浴锅中预热 30 min。
3. 依次在微量石英比色皿/96 孔板中按顺序加入下列试剂

试剂名称	测定管 (μL)
AK297-C	20
AK297-D	20
AK297-E	20
AK297-B	120
样本	20
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. 按照样本蛋白浓度计算

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。

$$\text{MDHAR (U/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 804 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本重量计算

MDHAR 活性单位定义：25℃中每克样本每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{MDHAR (U/g)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 804 \times \Delta A \div W$$

3. 按照细胞数量计算

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

$$\text{MDHAR (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 804 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

4. 按照液体体积计算

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

$$\text{MDHAR (U/mL)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 804 \times \Delta A$$

注：ε：NADH 摩尔消光系数，6220 L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V_{反总}：反应体系总体积，0.2mL=2×10⁻⁴L；V_样：加入反应体系中上清液体积，20μL=0.02mL；V_{样总}：AK297-A 体积，1 mL；Cpr：上清液蛋白浓度，mg/mL，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℃中每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{MDHAR (U/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按样本质量计算

MDHAR 活性单位定义：25℃中每克样本每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{MDHAR (U/g)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div W$$

3. 按细胞数量计算

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

$$\text{MDHAR (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

4. 按液体体积计算

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

$$\text{MDHAR (U/mL)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1608 \times \Delta A$$

注：ε：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，0.2mL=2×10⁻⁴L；V_样：加入反应体系中上清液体积，20μL=0.02mL；V_{样总}：AK297-A 体积，1 mL；Cpr：上清液蛋白浓度，mg/mL，W：样品质量；T：反应时间，2min。

注意事项：

1. 临用前配制的试剂未使用完的 4℃保存，3 天内使用完。
2. 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit (C05-02001)