

上海茁彩生物科技有限公司  
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0315

Size: 100T/96S

## 单脱氢抗坏血酸还原酶 (MDHAR) 检测试剂盒说明书

### 微量法

\*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

#### 一、测定意义:

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。

#### 二、测定原理:

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

#### 三、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 孔板 (ZC-1036: UV 板)、可调式移液枪和双蒸水。

#### 四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体×1 瓶	室温保存	
试剂三	粉剂×1 瓶 (棕色)	4°C 保存	临用前加入 3mL 蒸馏水充分溶解
试剂四	粉剂×1 瓶	4°C 保存	临用前加入 2.5mL 蒸馏水充分溶解
试剂五	液体×1 瓶	4°C 保存	临用前加 3mL 试剂二充分溶解

## 五、粗酶液提取：

1. 组织：按照组织质量 (g) : 试剂一体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂一) 进行冰浴匀浆。8000g, 4°C 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) : 试剂一体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一), 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°C 离心 20min, 取上清液置冰上混匀待测。
3. 血清等液体：直接测定。

## 六、MDHAR 测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长到 340nm, 蒸馏水调零。
2. 试剂二在 25°C 水浴锅中预热 30min。
3. 依次在微量石英比色皿/96 孔板中加入 20 μL 试剂三、20 μL 试剂四、20 μL 试剂五和 120 μL 试剂二, 最后加入 20 μL 上清液, 迅速混匀后于 340nm 比色, 记录 30s 和 150s 的吸光值 30s 和 150s 的吸光值 A1 和 A2,  $\Delta A = A1 - A2$ 。

## 七、MDHAR 活性计算公式：

- 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

MDHAR 活性单位定义：25°C 中每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

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

### (2). 按样本质量计算

MDHAR 活性单位定义：25°C 中每克样本每分钟氧化 1nmol NADH 为 1U。

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

### (3). 按细胞数量计算

MDHAR 活性单位定义：25°C 中每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

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

(4). 按液体体积计算

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

$$\text{MDHAR (nmol/min /mL)} = \Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \div T = 804 \times \Delta A$$

$\varepsilon$  : 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<sup>-4</sup> L; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 20 μL=0.02mL; V 样总: 提取液体积, 1 mL; 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; T: 反应时间, 2min。

● 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°C中每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{MDHAR (nmol/min /mg prot)} = \Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div Cpr$$

(2). 按样本质量计算

MDHAR 活性单位定义：25°C中每克样本每分钟氧化 1nmol NADH 为1U。

$$\text{MDHAR (nmol/min /g)} = \Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细胞数量计算

MDHAR 活性单位定义：25°C中每10<sup>4</sup>个细胞每分钟氧化 1nmol NADH 为1个酶活单位。

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

(4) 按液体体积计算

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

$$\text{MDHAR (nmol/min /mL)} = \Delta A \div \varepsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \div T = 1608 \times \Delta A$$

$\varepsilon$  : 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<sup>-4</sup> L; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 20 μL=0.02mL; V 样总: 提取液体积, 1 mL; 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; T: 反应时间, 2min。

## 八、注意事项:

临用前配制的试剂未使用完的 4°C保存, 3天内使用完。