

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-S0587

Size: 50T/48S

单脱氢抗坏血酸还原酶 (MDHAR) 检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

*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 MDHA 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 NAD^+ , NADH 在 340nm 有特征吸收峰, 但 NAD^+ 没有。通过测定 340nm 光吸收下降速率, 来计算 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、1mL 石英比色皿、可调式移液器、蒸馏水。

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℃保存	
试剂二	液体×1 瓶	室温保存	
试剂三	粉剂×1 瓶 (棕色)	4℃保存	临用前加入 5mL 双蒸水充分溶解
试剂四	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入 5mL 双蒸水充分溶解
试剂五	液体×1 瓶	4℃保存	临用前加入 5mL 试剂二充分溶解

五、操作步骤：

1. 粗酶液提取：

- (1) 组织：按照组织质量 (g) : 试剂一体积 (ml) 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。10000rpm, 4°C离心 10min, 取上清置冰上待测。
- (2) 细菌、真菌：按照细胞数量 (10^4 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), 冰浴超声破碎细胞 (功率 300w, 超声 3s, 间隔 7s, 总时间 3min); 然后 10000rpm, 4°C, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

2. DHAR 测定操作：

- (1) 分光光度计预热 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 以上。
- (3) 空白管: 在 1mL 石英比色皿中依次加入 100 μ L 试剂三、100 μ L 试剂四和 100 μ L 试剂五、600 μ L 试剂二, 最后加入 100 μ L 蒸馏水, 迅速混匀后于 340nm 比色, 记录 30s 和 150s 的吸光值 A1 和 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。
- (4) 测定管: 在 1mL 石英比色皿中依次加入 100 μ L 试剂三、100 μ L 试剂四和 100 μ L 试剂五、600 μ L 试剂二, 最后加入 100 μ L 上清液, 迅速混匀后于 340nm 比色, 记录 30s 和 150s 的吸光值 A3 和 A4, $\Delta A = A3 - A4$ 。

六、DHAR 活力计算：

(1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义：25°C 中每毫克蛋白每分钟氧化 1 μ mol NADH 为 1U。

$$\text{MDHAR (U/mg prot)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T$$
$$= 0.804 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

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

$$\text{MDHAR (U/g)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \varepsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$
$$= 0.804 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：25°C中每 10^4 个细胞每分钟氧化 1 μmol NADH 为 1U。

$$\text{MDHAR (U/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \varepsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^6] \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$
$$= 0.804 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

ε : NADH 摩尔吸光系数, 6220L/mol/cm; d : 比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应体系总体积, 1mL=0.001L; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 100 μL =0.1mL; C_{pr} : 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 BCA 蛋白质含量测定试剂盒 (货号: ZC-S0470); V 样总: 加入提取液体积, 1ml; W , 样本质量, g; T : 反应时间, 2min。