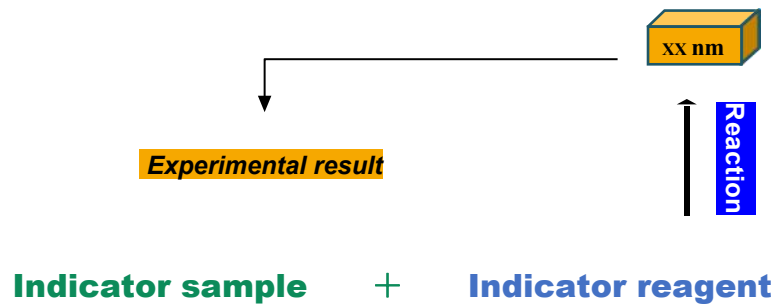


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

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

产品内容：

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

试验中所需的仪器和试剂：

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。

产品说明：

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。

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。

操作步骤：

一、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℃离心10min，取上清置冰上待测。
2. 细菌、真菌：按照细胞数量（10⁴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℃，离心10min，取上清置于冰上待测。

二、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℃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 μL试剂三、100 μL试剂四和100 μL试剂五、600 μL 试剂二，最后加入100 μL 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 μL试剂三、100 μL试剂四和100 μL试剂五、600 μL 试剂二，最后加入100 μL 上清液，迅速混匀后于340nm比色，记录30s和150s的吸光值A3和A4， $\Delta A=A3-A4$ 。。

三、DHAR活力计算：

(1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义：25℃中每毫克蛋白每分钟氧化1 μmol 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℃中每克样本每分钟氧化1 μmol NADH为1U。

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

$$= 0.804 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W$$

(3) 按细胞数量计算

活性单位定义：25℃中每10⁴个细胞每分钟氧化1 μmol NADH为1U。

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

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； 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 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。