

## 单脱氢抗坏血酸还原酶 (MDHAR) 检测试剂盒 (微量法)

**注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。**

### 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。

### 测定原理：

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

### 试剂组成和配制：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 20mL×1 瓶，室温保存。

试剂三：粉剂×1 瓶（棕色），4℃ 保存。临用前加入 3 mL 蒸馏水充分溶解。

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加入 2.5 mL 蒸馏水充分溶解。

试剂五：液体 15μL×1 瓶，4℃ 保存。临用前加 3 mL 试剂二充分溶解。

### 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℃ 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℃ 离心 20min，取上清液置冰上混匀待测。
- 3. 血清等液体：**直接测定。

### MDHAR 测定步骤：

1. 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. 试剂二在 25℃ 水浴锅中预热 30 min。
3. 依次在微量石英比色皿/96 孔板中加入 20μL 试剂三、20μL 试剂四、20μL 试剂五和 120μL 试剂二，最后加入 20μL 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， $\Delta A = A1 - A2$ 。

### 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。

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

- (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 1U。

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

$$= 804 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细胞数量计算

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

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

(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。

$$\begin{aligned} \text{MDHAR (nmol/min /mL)} &= \Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9 \div V \text{ 样} \div T \\ &= 804 \times \Delta A \end{aligned}$$

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<sup>-4</sup>L;

V 样: 加入反应体系中上清液体积, 20μL=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。

## 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。

$$\begin{aligned} \text{MDHAR (nmol/min /mg prot)} &= \Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9 \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 1608 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(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 1U。

$$\begin{aligned} \text{MDHAR (nmol/min /g 鲜重)} &= \Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9 \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 1608 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(3) 按细胞数量计算

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

$$\begin{aligned} \text{MDHAR (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= \Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9 \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 1608 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{MDHAR (nmol/min /mL)} &= \Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9 \div V \text{ 样} \div T \\ &= 1608 \times \Delta A \end{aligned}$$

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<sup>-4</sup>L;

V 样: 加入反应体系中上清液体积, 20μL=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。

## 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。