

单脱氢抗坏血酸还原酶（MDHAR）试剂盒说明书

（货号：G0213W 微板法 96 样）

一、产品简介：

单脱氢抗坏血酸还原酶（MDHAR，EC 1.6.5.4）是使抗坏血酸（AsA）再生的关键酶之一，催化 MDHA 重新还原成 AsA，对于维持抗坏血酸的抗氧化特性具有重要作用。

MDHAR 催化 NADH 还原 MDHA 生成 AsA 和 NAD^+ ，通过测定 NADH 在 340 nm 处的光吸收下降速率，来计算出 MDHAR 活性。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 mg×4 支	-20℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部，每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存(可保存一个月)，禁止反复冻融，解冻后可 4℃保存并一周内使用完。
试剂三	粉剂 mg×3 支	4℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部，再每支加 2mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存(可保存一个月)，禁止反复冻融，解冻后可 4℃保存并一周内使用完。
试剂四	液体 0.12mL×2 支	-20℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部，可分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板（UV 板）、研钵、冰、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅。

四、单脱氢抗坏血酸还原酶（MDHAR）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：

取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注意】若样本颜色较深（如植物叶片），可引起起始值 A_{11} 值较大如超过 2，可在样本制备过程中增加除色素步骤：取约 0.2g 组织（水分充足的样本可取 1g），加入 90%乙醇冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，弃掉色素较深的上清液；以上除色素步骤重复 2 次。最后向离心得到的沉淀中加入 1mL 提取液，混匀或再次冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

② 液体样本：直接测定。若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 打开酶标仪，设置温度 25℃，调节波长到 340 nm。

② 试剂一在 25℃水浴锅中预热 30 min。

③ 在 96 孔 UV 板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	138
试剂二	20
试剂三	20
试剂四	2
轻轻混匀, 25°C条件下, 于 340nm 处检测, 分别于 10s 和 5min10s 读取吸光值 A1 和 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。	

- 【注】1.若 ΔA 值小于 0.01, 可适当延长反应时间 T (如由 5min10s 延长到 10min10s 或更长时间读取 A2)。或适当加大样本量 V1 (如由 20μL 增至 40μL, 则试剂一相应减少), 则改变后的 T 和 V1 需代入公式重新计算。
- 2.若起始值 A 太大如超过 2 (如颜色较深的植物叶片, 一般色素较高, 则起始值相对会偏高), 可对叶片进行除色素处理 (参考样本制备阶段注意事项) 或适当减少样本加样量 V1 (如由 20μL 减至 10μL, 则试剂一相应增加), 则改变后的 V1 需代入公式重新计算。
- 3.若下降趋势不稳定, 可以每隔 10S 读取一次吸光值, 选取一段线性下降的时间段来参与计算, 相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、按蛋白浓度计算:

活性定义: 在 25°C反应条件下, 每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{MDHAR (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T = 643.1 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本质量计算:

活性定义: 在 25°C反应条件下, 每克样本每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{MDHAR (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div W$$

3、按液体体积计算:

活性定义: 在 25°C反应条件下, 每毫升液体每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{MDHAR (nmol/min/mL)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 643.1 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数, 6220 L/mol/cm;

d---96 孔板光径, 0.5cm;

V---提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 20μL=0.02mL;

V2---反应体系总体积, 200μL=2×10⁻⁴L;

W---样品质量, g;

T---反应时间, 5min;

Cpr---上清液蛋白浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。