

## 单脱氢抗坏血酸还原酶（MDHAR）试剂盒说明书

（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  $\text{NAD}^+$ ，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×2 支	-20℃ 保存	使用前甩几下或 4℃ 离心使试剂落入试管底部，再每支加 1.1mL 蒸馏水充分溶解，仍-20℃ 保存，且一周内用完。
试剂三	粉剂 mg×1 瓶	4℃ 保存	使用前甩几下或 4℃ 离心使试剂落入试管底部，再加 3.4mL 的蒸馏水溶解。
试剂四	液体 0.12mL×2 支	-20℃ 保存	使用前甩几下或 4℃ 离心使试剂落入试管底部，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】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取

##### 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 酶标仪预热 30 min，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（ $\mu\text{L}$ ）	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℃，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 $\Delta A$  的值在零附近，可以适当延长反应时间到 10min30s 读取 A2，改变后的反应时间需代入计算公式重新计算。或适当加大样本量，则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。
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)，可以适当减少样本加样量，则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。
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℃ 反应条件下，每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

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

### 2、按样本质量计算

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

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

### 3、按液体体积计算

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

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

$\epsilon$ ---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，20 $\mu$ L=0.02mL；

V2---反应体系总体积，200 $\mu$ L=2 $\times$ 10<sup>-4</sup>L；

W---样品质量；

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。