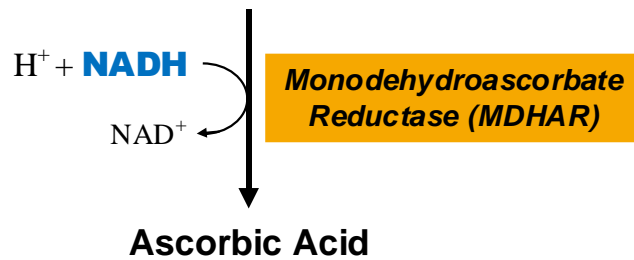




单脱氢抗坏血酸还原酶 (MDHAR) 活性检测试剂盒

Monodehydroascorbate Reductase (MDHAR) Activity Assay Kit

Monodehydroascorbic Acid



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



单脱氢抗坏血酸还原酶 (MDHAR) 活性检测试剂盒

Monodehydroascorbate Reductase (MDHAR) Activity Assay Kit

一、产品描述

单脱氢抗坏血酸还原酶 (MDHAR) 是机体内抗坏血酸 (Ascorbic Acid, AsA) 再生的关键酶, 能够将单脱氢抗坏血酸 (Monodehydroascorbate, MDHA) 还原为抗坏血酸, 维持机体内抗坏血酸的水平, 在抗坏血酸氧化还原代谢和植物抵抗逆境胁迫过程中具有重要作用。

单脱氢抗坏血酸还原酶催化 NADH 还原 MDHA 生成 AsA 和 NAD⁺, NADH 在 340 nm 处有特征吸收峰, 通过吸光值的变化即可表征单脱氢抗坏血酸还原酶的活性。

二、产品内容

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 110 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂一	液体 12 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂二	粉剂×1 瓶	4°C保存	使用前加入 2 mL 蒸馏水充分溶解
试剂三	粉剂×1 瓶	-20°C避光保存	使用前加入 3.333 mL 蒸馏水充分溶解
试剂四	液体×1 瓶	-20°C避光保存	使用前加入 2 mL 试剂一充分溶解

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器: 紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔 UV 板、台式离心机、可调式移液器、恒温水浴、研钵/匀浆器和蒸馏水。

1. 样品处理

①组织: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: (5-10) 的比例 (建议称取约 0.1 g 组织, 加入 1 mL 提取液) 处理样品, 冰浴匀浆, 4°C 10000 rpm 离心 10 min, 取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞: 按照细菌或细胞数量 (10⁴ 个): 提取液体积 (mL) 为 (500-1000): 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液) 处理样品, 冰浴超声破碎细菌或细胞 (功率 300 W, 超声 3 s, 间隔 7 s, 总时间 3 min), 4°C 10000 rpm 离心 10 min, 取上清置于冰上待测。

2.测定步骤

- ①紫外分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm，蒸馏水调零。
- ②使用前将试剂一在 25°C 水浴中预热 30min。
- ③在微量石英比色皿/96 孔 UV 板中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	空白组 (μL)
待测样品	60	-
蒸馏水	-	60
试剂一	80	80
试剂二	20	20
试剂三	20	20
试剂四	20	20

吸光值测定：①迅速混匀并开始计时，测定 30 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，分别记为 A1 测定、A1 空白；②准确反应 120 s 后，测定 150 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，分别记为 A2 测定、A2 空白；③计算 ΔA 测定=A1 测定-A2 测定， ΔA 空白=A1 空白-A2 空白， $\Delta A = \Delta A$ 测定- ΔA 空白。注：空白组只需测定 1-2 次。

3.单脱氢抗坏血酸还原酶（MDHAR）活性计算

3.1 使用微量石英比色皿进行测定的计算公式

- ①按组织样本蛋白浓度计算

单位定义：25°C 条件下每毫克蛋白每分钟氧化 1 μmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MDHAR (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^6}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{0.268 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

- ②按组织样本质量计算

单位定义：25°C 条件下每克样品每分钟氧化 1 μmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MDHAR (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^6}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{0.268 \times \Delta A}{W}$$

- ③按细菌或细胞数量计算

单位定义：25°C 条件下每 10^4 个细菌或细胞每分钟氧化 1 μmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MDHAR (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^6}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times \text{细菌或细胞数量} \times T} = \frac{0.268 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

注释： V 反总：反应体系总体积，200 $\mu\text{L} = 2 \times 10^{-4}$ L；V 样：反应体系中加入上清液的体积，60 $\mu\text{L} = 0.06$ mL； ϵ ：NADH 摩尔消光系数为 6.22×10^3 L/mol/cm；d：比色皿光径，1 cm； 10^6 ：1 mol = 1×10^6 μmol ；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量，g；细胞数量：以万计；T：反应时间，2 min。

3.2 使用 96 孔 UV 板进行测定的计算公式

①按组织样本蛋白浓度计算

单位定义：25℃条件下每毫克蛋白每分钟氧化 1 μmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MDHAR (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^6}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{0.536 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：25℃条件下每克样品每分钟氧化 1 μmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MDHAR (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^6}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{0.536 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：25℃条件下每 10⁴ 个细菌或细胞每分钟氧化 1 μmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MDHAR (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^6}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times \text{细菌或细胞数量} \times T} = \frac{0.536 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

注释： V 反总：反应体系总体积，200 μL=2×10⁻⁴ L；V 样：反应体系中加入上清液的体积，60 μL=0.06 mL；ε：NADH 摩尔消光系数为 6.22×10³ L/mol/cm；d：96 孔 UV 板，0.5 cm；10⁶：1 mol=1×10⁶ μmol；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量，g；细胞数量：以万计；T：反应时间，2 min。

四、注意事项

①若 ΔA 测定大于 0.3 时（96 孔 UV 板 ΔA 测定大于 0.2），建议将样本稀释或者调整待测样品和试剂一的比例（如将 60 μL 待测样品+80 μL 试剂一改为 20 μL 待测样品+120 μL 试剂一）后再进行测定；若 ΔA 测定过小时，建议提高样本量或者调整待测样品和试剂一的比例（如将 60 μL 待测样品+80 μL 试剂一改为 100 μL 待测样品+40 μL 试剂一）；

②若 A1 测定大于 1.5 时（酶标仪测定时 A1 大于 2 时），建议将样本稀释后再进行测定；

③空白组为检测各组试剂的检测孔，正常情况下，A 空白应为 0.5 左右（96 孔 UV 板在 0.3 左右），变化小于 0.01；

④准确在 30 s 和 150 s 处完成读数，以保证实验结果的准确性；

⑤为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

