

## 单脱氢抗坏血酸还原酶（MDHAR）试剂盒说明书

（货号：BP10225W 微板法 96 样 有效期：6 个月）

### 一、指标简介：

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：

| 试剂组分 | 试剂规格             | 存放温度   | 注意事项                                                                                                                  |
|------|------------------|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 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 4 支           | -20℃保存 | 每支：<br>1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底；<br>2. 加入 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)；<br>3. 禁止反复冻融，解冻后可 4℃存放并于一周内用完。 |
| 试剂三  | 粉剂 3 支           | 4℃保存   | 每支：<br>1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底；<br>2. 加入 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)；<br>3. 禁止反复冻融，解冻后可 4℃存放并于一周内用完。   |
| 试剂四  | 液体 0.12mL<br>2 支 | -20℃保存 | 每支：<br>1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底；<br>2. 分装后-20℃保存，禁止反复冻融（保存周期与试剂盒有效期相同）。                                         |

### 三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板（UV 板）、离心管、酶标仪。

### 四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

#### 1、样本提取：

##### ① 动、植物组织样本：

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 A1 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。

③ 细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，冰浴匀浆（可使用各类常见电动匀浆器），12,000rpm 4℃ 离心 10min，取上清待测。

## 2、检测步骤：

- ① 打开酶标仪，设置温度 25℃（若仪器无法控温，则等待仪器过自检程序即可），调节波长到 340 nm。
- ② 试剂一在 25℃水浴锅中预热 30 min。
- ③ 按照下表在 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   |
| 混匀，25℃条件下，于 340nm 处检测，分别读取 10s 和 5min10s 的吸光值，并记录为 A1 和 A2， $\Delta A = A1 - A2$ 。 |     |

- 【注】1.若 $\Delta A$ 值小于 0.01，可延长反应时间 T（如由 5min10s 延长到 10min10s 或更长时间读取 A2）。也可适当加大样本量 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 A1 太大，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，相应的 A 值也代入计算公式重新计算。
- 4.本指标可与我司 DHAR、GR、APX、AAO、GSH-Px、TrxR、TPX、SOD、CAT、POD、MDA、PPO、BCA 等指标共同提取，更多指标详询我司。

## 五、结果计算：

### 1、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。

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

### 2、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。

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

### 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。

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

### 4、按细菌/细胞数量计算：

活性定义：在 25℃反应条件下，每 10<sup>4</sup> 个细菌/细胞每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{MDHAR (nmol/min/mL)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 1.286 \times \Delta A$$

$\epsilon$ ---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，20μL=0.02mL；

V2---反应体系总体积，200μL=2×10<sup>-4</sup>L；

500---细菌/细胞数量，万；

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。