

单脱氢抗坏血酸还原酶（MDHAR）检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1008

保存：-20℃避光保存 6 个月

规格：48T/96T

适用样本：动植物组织、细胞、细菌、液体样本

产品简介

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。本试剂盒提供了一种简单、方便、快速的 MDHAR 活性检测方法，其原理是抗坏血酸氧化酶（AAO）将还原态的维生素 C（AsA）氧化成其自由基形式（MDHA），MDHAR 催化 NADH 还原 MDHA 生成 AsA 和 NAD⁺，NADH 在 340nm 有特征吸收峰，但是 NAD⁺没有。通过测定 340nm 光吸收下降速率，来计算出 MDHAR 活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
试剂一	50mL	100mL	4℃ 保存
试剂二	10mL	20mL	4℃ 保存
试剂三	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	4℃ 避光保存
试剂四	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	4℃ 避光保存
试剂五	60 μ L	120 μ L	-20℃ 保存

自备耗材

酶标仪或分光光度计（能测 340nm 处的吸光度）
 96 孔 UV 板或微量石英比色皿、可调节式移液枪及枪头
 水浴锅、制冰机，低温离心机
 去离子水
 匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

试剂一：即用型；4℃ 保存。
 试剂二：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。
 试剂三：临用前配制，每瓶加入 1.5mL 去离子水，充分溶解备用。未用完的试剂可 4℃ 保存一周或分装-20℃ 避光保存，避免反复冻融，可保存数月，实验时冰上放置。
 试剂四：临用前配制，每瓶加入 1.25mL 去离子水，充分溶解备用。未用完试剂分装-20℃ 保存，避免反复冻融，可保存 1 个月，实验时冰上放置。
 试剂五：临用前用试剂二进行 1:20 稀释，整个实验过程中，冰上避光放置。现用现配，用多少配多少；保存于-20℃。

样本制备

动植物组织：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 试剂一冰浴匀浆，8,000g，4℃ 离心 10min，取上清液置冰上待测。

产品说明书

细胞或细菌：收集 500 万细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1mL 试剂一，超声波破碎细胞或细菌 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），8,000g，4℃离心 10min，取上清液置冰上待测。

液体样本：直接测定，根据预实验确定稀释倍数。

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。试剂一含有还原剂不适合测定蛋白浓度。

实验步骤

1. 酶标仪或分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 340nm。分光光度计去离子水调零。

2. 试剂二在 25℃水浴锅中预热 30min。

在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中依次加入 20 μL 试剂三、20 μL 试剂四、20 μL 试剂五和 120 μL 试剂二，最后加入 20 μL 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 A_1 和 A_2 ，计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

注意：1. 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果 ΔA 小于 0.001 可将反应时间延长 5 分钟，计算时调整公式中的时间；如果 ΔA 大于 0.5，可用试剂一稀释样品，计算时结果乘以稀释倍数。

2. 测定反应的温度对测定结果有影响，请控制在 25℃。

3. 因通过反应速率计算酶活，使用 96 孔 UV 板时请根据操作速度控制一次测定的样本数（通常一次测定 4-8 个样本），不推荐同时测多个样本。

结果计算

A. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MDHAR (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 1607.72 \times \Delta A \div W$$

2. 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MDHAR (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 3.22 \times \Delta A$$

3. 按液体体积计算：

单位的定义：每 mL 液体样本在反应体系中每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MDHAR (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1607.72 \times \Delta A$$

$V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 mol/L/cm； d ：96 孔板光径，0.5cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.02mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入试剂一体积，1mL； T ：反应时间，2min； W ：样品质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

B. 使用微量石英比色皿测定的计算公式

将上述计算公式中的光径 d :0.5cm 调整为 d :1cm 进行计算即可。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1030 还原型抗坏血酸 (AsA) / 维生素 C 检测试剂盒（微量法）

PMK1034 抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 检测试剂盒（微量法）

PMK1035 脱氢抗坏血酸还原酶 (DHAR) 检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

