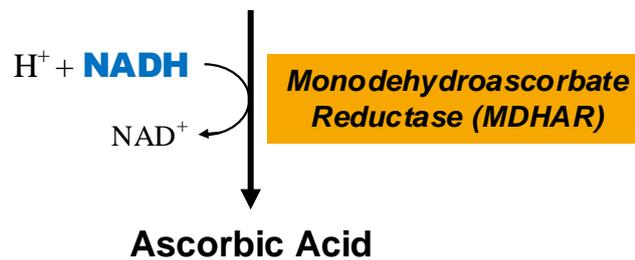




单脱氢抗坏血酸还原酶 (MDHAR) 活性检测试剂盒
Monodehydroascorbate Reductase (MDHAR) Activity Assay Kit

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

| 名称 | 试剂规格 | 储存条件 | 使用方法及注意事项 |
|-----|--------------|------------|----------------------------------------------|
| 提取液 | 液体 60 mL×1 瓶 | 4°C 保存 | - |
| 试剂一 | 液体 30 mL×1 瓶 | 4°C 保存 | - |
| 试剂二 | 粉剂×1 瓶 | 4°C 保存 | 使用前加入 5 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 5 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后 -20°C 保存, 避免反复冻融) |
| 试剂四 | 液体×1 瓶 | -20°C 避光保存 | 使用前加入 5 mL 试剂一充分溶解 (分装后 -20°C 保存, 避免反复冻融) |

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、1 mL 石英比色皿 (光径 10 mm)、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴和蒸馏水。

1. 粗酶液的制备 (可根据预实验结果适当调整样本量及比例)

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紫外分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm，蒸馏水调零。
- ②试验前将试剂一 25°C 预热 30 min。
- ③在 1 mL 石英比色皿中依次加入下列试剂：

| 试剂 | 测定组 (μL) | 空白组 (μL) |
|-----|--------------------------|--------------------------|
| 试剂二 | 100 | 100 |
| 试剂三 | 100 | 100 |
| 试剂四 | 100 | 100 |
| 试剂一 | 400 | 400 |
| 粗酶液 | 300 | - |
| 蒸馏水 | - | 300 |

吸光值测定：①迅速混匀并开始计时，测定 30 s 时 340 nm 处吸光值，记为 A1 测定和 A1 空白；②测定 150 s 时 340 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 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

- ①按组织蛋白浓度计算

单位定义：25°C 条件下每 mg 组织蛋白每分钟氧化 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 g 组织每分钟氧化 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，1000 μL =1 $\times 10^{-3}$ L；V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，300 μL =0.3 mL； ϵ ：NADH 摩尔消光系数为 6.22×10^3 L/mol/cm；d：1 mL 石英比色皿光径，1 cm；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样品质量，g；细菌或细胞数量：以万计；T：反应时间，2 min； 10^6 ：1 mol=1 $\times 10^6$ μmol 。

四、注意事项

①若 ΔA 测定大于 0.3 时，建议将粗酶液适当稀释或者调整粗酶液和试剂一的比例（如将 300 μL 待测样品+400 μL 试剂一改为 100 μL 待测样品+600 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 300 μL 待测样品+400 μL 试剂一改为 500 μL 待测样品+200 μL 试剂一）；

②若 A1 测定大于 1.3 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，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.

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

