

单脱氢抗坏血酸还原酶 (MDHAR) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

注意: 正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义:

MDHAR 催化 MDHA 还原生成 AsA, 在抗坏血酸氧化还原代谢中具有重要作用。

测定原理:

MDHAR 催化 NADH 还原 MDHA 生成 AsA 和 NAD⁺, NADH 在 340 nm 有特征吸收峰, 但是 NAD⁺没有。通过测定 340 nm 光吸收下降速率, 来计算出 MDHAR 活性。

需自备的仪器和用品:

研钵、冰、台式离心机、紫外分光光度计、1mL 石英比色皿、可调式移液枪和双蒸水。

试剂组成和配置:

试剂一: 液体 50mL×1 瓶, 4°C保存。

试剂二: 液体 50mL×1 瓶, 室温保存。

试剂三: 粉剂×1 瓶 (棕色), 4°C保存。临用前加入 5mL 蒸馏水充分溶解。

试剂四: 粉剂×1 瓶, 4°C保存。临用前加入 5mL 蒸馏水充分溶解。

试剂五: 液体 25μL×1 瓶, 4°C保存。临用前加 5mL 试剂二充分溶解。

粗酶液提取:

1、组织: 按照组织质量 (g) : 试剂一体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂一) 进行冰浴匀浆。8000g, 4°C离心 10min, 取上清置冰上待测。

2、细菌、真菌: 按照细胞数量 (10⁴ 个) : 试剂一体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 8000g, 4°C离心 20min, 取上清液置冰上混匀待测。

3、血清等液体: 直接测定。

MDHAR 测定操作:

1、分光光度计预热 30 min, 调节波长到 340 nm, 蒸馏水调零。

2、试剂二在 25°C水浴锅中预热 30 min。

3、依次在比色皿中加入 100μL 试剂三、100μL 试剂四、100μL 试剂五和 600μL 试剂二, 最后加入 100μL 上清液, 迅速混匀后于 340nm 比色, 记录 30s 和 150s 的吸光值 A1 和 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。

MDHAR 活性计算公式:

(1). 按蛋白浓度计算

MDHAR 活性单位定义: 25°C中每毫克蛋白每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

MDHAR (nmol/min /mg prot) = $\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 804 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

(2). 按样本质量计算

MDHAR 活性单位定义: 25°C中每克样本每分钟氧化 1nmol NADH 为 1U。MDHAR (nmol/min /g 鲜重) = $\Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 804 \times \Delta A \div W$

(3). 按细胞数量计算

MDHAR 活性单位定义: 25°C中每 10^4 个细胞每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{MDHAR (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9}{(\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T} = 804 \times \frac{\Delta A}{\text{细胞数量}}$$

(4). 按液体体积计算

MDHAR 活性单位定义: 25°C中每毫升液体每分钟氧化 1nmol NADH 为 1 个酶活单位。

$$\text{MDHAR (nmol/min /mL)} = \frac{\Delta A \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times 10^9}{V \text{ 样}} \div T = 804 \times \frac{\Delta A}{V}$$

ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6220 L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应体系总体积, 1mL=0.001 L, V 样: 加入反应体系中上清液体积, 100 μ L=0.1mL; Cpr: 上清液蛋白浓度, mg/mL, 蛋白质浓度需要另外测定, 建议使用本公司蛋白质含量 BCA 试剂盒; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; W, 样本质量, g; T: 反应时间, 2min。

注意事项:

临用前配制的试剂未使用完的 4°C保存, 3 天内使用完。



Lifemall.asia

To be with you