

单脱氢抗坏血酸还原酶 (MDHAR) 活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

货号: AC10182

规格: 50T/48S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂三	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂四	液体×1 瓶	-20°C保存

溶液的配制:

- 1、试剂二: 临用前加入 5 mL 蒸馏水充分溶解, 4°C保存;
- 2、试剂三: 临用前加入 5 mL 蒸馏水充分溶解, 可溶解后分装-20°C保存, 避免反复冻融;
- 3、试剂四: 液体置于试剂瓶内 EP 管中。临用前加 5 mL 试剂一充分溶解, 可溶解后分装-20°C保存, 避免反复冻融。

产品说明:

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。

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340 nm光吸收下降速率, 来计算出MDHAR活性。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

研钵/匀浆器、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。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

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

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

二、测定步骤

1、分光光度计预热30min, 调节波长到340nm, 蒸馏水调零。

2、试剂一在25°C水浴锅中预热30min。

3、依次在石英比色皿中加入下列试剂

试剂名称 (μL)	空白管	测定管
试剂二	100	100
试剂三	100	100
试剂四	100	100
试剂一	400	400
蒸馏水	300	
上清液		300

迅速混匀后于 340nm 比色, 记录 30s 和 150s 的吸光值。分别记为 A1、A2, $\Delta A = A1 - A2$, 得到 ΔA 测定管、 ΔA 空白管。

三、MDHAR 活性计算

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1μmol NADH为一个酶活单位。

$$\text{MDHAR (U/mg prot)} = [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T$$

$$= 0.268 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div C_{\text{pr}}$$

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1μmol NADH为一个酶活单位。

$$\text{MDHAR (U/g 质量)} = [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T$$

$$= 0.268 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W$$

3、按细胞数量计算

MDHAR活性单位定义: 25°C中每10⁴个细胞每分钟氧化1μmol NADH为一个酶活单位。

$$\text{MDHAR (U/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^6] \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 0.268 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{细胞数量}$$

ϵ : NADH摩尔消光系数, 6220 L/mol/cm; d : 比色皿光径, 1cm; 10^6 : 单位换算系数, 1mol=1×10⁶μmol; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 1mL=0.001L; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积, 300μL=0.3mL; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1mL; C_{pr} : 上清液蛋白浓度, mg/mL, 蛋白质浓度需要另外测定; W : 样本质量, g; 细胞数量: 以10⁴为单位计量, 万个; T : 反应时间, 2min。

注意事项:

1. 当 ΔA 测定大于 0.3 时, 建议客户稀释样本或者调整试剂一和上清液的比例 (如将 400μL 试剂一+300μL 上清液改为 600μL 试剂一+100μL 上清液) 后进行测定。
2. 当 ΔA 测定过小时, 建议客户提高样本量或者调整试剂一和上清液的比例 (如将 400μL 试剂一+300μL 上清液改为 200μL 试剂一+500μL 上清液)。
3. 当 A1 大于 1.5 时, 建议将样本稀释进行测定。
4. 空白管为检测各管试剂组份的检测孔, 正常情况下, 其 OD 值在 0.5 左右, 变化不超过 0.01。
5. 由于提取液中含有一定浓度的蛋白 (约 1mg/mL), 所以在测定样品蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白含量。

实验实例:

1、取 0.1g 橙子果肉加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆。10000rpm, 4°C离心 10min, 取上清置冰上, 按照测定步骤操作, 测得计算 ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定=0.827-0.8=0.027, ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白=0.536-0.532=0.004, 按样本质量计算酶活得:

$MDHAR (U/g \text{ 质量}) = 0.268 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W = 0.268 \times (0.027 - 0.004) \div 0.1 = 0.06164 U/g \text{ 质量}。$

相关发表文献:

[1] Yali Zhou, Sufang Huo, Liting Wang, et al. Exogenous 24-Epibrassinolide alleviates oxidative damage from copper stress in grape (*Vitis vinifera* L.) cuttings. *Plant Physiology and Biochemistry*. September 2018; (IF3.404)