

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K816-M

产品规格: 48T(23 samples)/96T(47 samples)

检测仪器: 酶标仪(340 nm)

Elabscience®二氢叶酸还原酶 (DHFR)

比色法测试盒

Dihydrofolate Reductase (DHFR) Activity

Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清(浆)、动植物组织、细胞样本中二氢叶酸还原酶(DHFR)的活力。

检测原理

二氢叶酸还原酶(Dihydrofolate Reductase, DHFR)是核酸代谢中关键的酶之一, 是癌症药物治疗中的主要靶酶, 近年来得到广泛的研究。

本测试盒检测原理: DHFR 催化底物反应消耗 NADPH, NADPH 在 340 nm 下有特征吸收峰, 通过测定 340 nm 处吸光度的下降速率即可表征 DHFR 的活性。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extraction Solution)	25 mL×1 瓶	50 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物储备液 (Substrate Stock Solution)	2 mL×1 瓶	4 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	缓冲液 (Buffer Solution)	14 mL×1 瓶	28 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 A (Substrate A)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	底物 B (Substrate B)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	基质液 (Matrix Solution)	0.9 mL×1 支	1.8 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	紫外酶标板	96 孔×1 块		无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明: 试剂严格按上表中的保存条件保存, 不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂, 使用前请先离心, 以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(最佳检测波长 340 nm)、恒温箱

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温(25℃)。

② 试剂四工作液的配制：

取一支试剂四用1 mL试剂二溶解，置于冰盒避光待用，未使用完的试剂四工作液可分装-20℃避光保存7天。

③ 底物工作液的配制：

将试剂四工作液：试剂三按体积比=5：18配制混匀，现配现用，可2-8℃避光保存8 h。

④ 试剂五工作液的配制：

取一支试剂五用1.4 mL双蒸水溶解，未使用完的试剂五工作液可分装-20℃避光保存7天。

⑤ 反应工作液的配制：

将试剂六：试剂三按体积比=1：9配制混匀，现配现用，可避光保存8 h。

样本准备

① 样本处理

血清(浆)样本：直接检测。

组织样本：按照组织样本质量(g)：试剂一体积(mL)=1：9的比例匀浆，4℃，10000 × g离心10 min，取上清液，置于冰上待测，5 h内有效。

细胞样本：取 1×10^6 个细胞加入200 μL试剂一比例匀浆，4℃，10000 × g离心10 min，取上清液，置于冰上待测，5 h内有效。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.02-400.00 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%大鼠肝组织	不稀释	10%小鼠脾组织	不稀释
10%小鼠肾组织	不稀释	10%小鼠肺组织	不稀释
10%绿萝叶组织	不稀释	1×10^6 个 HeLa 细胞	不稀释
大鼠血清	不稀释		

注：稀释液为试剂一。

操作步骤

- ① 空白孔：取 20 μL 双蒸水加入相应的酶标孔中。
测定孔：取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
对照孔：取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①空白孔和测定孔中加入 20 μL 底物工作液。
- ③ 向步骤②各孔中加入 20 μL 试剂五工作液。
- ④ 向步骤③空白孔和测定孔中加入 140 μL 反应工作液，对照孔中加入 160 μL 反应工作液。
- ⑤ 振板 5 s，酶标仪于 340 nm 处检测各孔吸光度 A_1 。
- ⑥ 37°C 避光孵育 25 min，酶标仪于 340 nm 处检测各孔吸光度 A_2 。

操作表

	空白孔	测定孔	对照孔
双蒸水(μL)	20	--	--
待测样本(μL)	--	20	20
底物工作液(μL)	20	20	--
试剂五工作液(μL)	20	20	20
反应工作液(μL)	140	140	160
振板 5 s，酶标仪于 340 nm 处检测各孔吸光度 A_1 。			
37°C 避光孵育 25 min，酶标仪于 340 nm 处检测各孔吸光度 A_2 。			

结果计算

① 血清(浆)样本中二氢叶酸还原酶(DHFR)酶活计算公式:

定义: 37°C 条件下, 每升血清(浆)每分钟催化消耗 1 μmol NADPH 的能力定义为一个酶活力单位。

$$\text{DHFR 活力 (U/L)} = (\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{对}} - \Delta A_{\text{空}}) \times V_{\text{总}} \times f \div \varepsilon \div d \div V_{\text{样}} \div T \times 10^6^*$$

② 组织样本中二氢叶酸还原酶(DHFR)酶活计算公式:

定义: 37°C 条件下, 每千克组织每分钟催化消耗 1 μmol NADPH 的能力定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{DHFR 活力 (U/kg wet weight)} &= (\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{对}} - \Delta A_{\text{空}}) \times V_{\text{总}} \times f \div \\ &\varepsilon \div d \div V_{\text{样}} \div T \div \frac{m}{V} \times 10^6^* \end{aligned}$$

③ 细胞样本中二氢叶酸还原酶(DHFR)酶活计算公式:

定义: 37°C 条件下, 每 1×10^6 个细胞每分钟催化消耗 1 μmol NADPH 的能力定义为一个酶活力单位。

$$\text{DHFR 活力 (U/10}^9) = (\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{对}} - \Delta A_{\text{空}}) \times V_{\text{总}} \times f \div \varepsilon \div d \div V_{\text{样}} \div T \div \frac{n}{V} \times 10^6^*$$

注解:

$\Delta A_{\text{测}}$: 测定孔 A_1 - 测定孔 A_2

$\Delta A_{\text{对}}$: 对照孔 A_1 - 对照孔 A_2

$\Delta A_{\text{空}}$: 空白孔 A_1 - 空白孔 A_2

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

$V_{\text{总}}$: 反应体系总体积, 0.2 mL

$V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.02 mL

T: 反应时间, 25 min

ε : 摩尔吸光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

d: 光径, 0.6 cm

m: 样本质量, g

n: 细胞样本的个数/ 1×10^6 个

v: 匀浆介质试剂一体积, mL

10^6 * : $1 \text{ mol/L} = 1000000 \text{ } \mu\text{mol/L}$

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.02-400 U/L	批间差	5.0-7.2%
灵敏度	0.02 U/L	批内差	2.5-3.6%
稀释回收率	98-100%		

附录2 实例分析

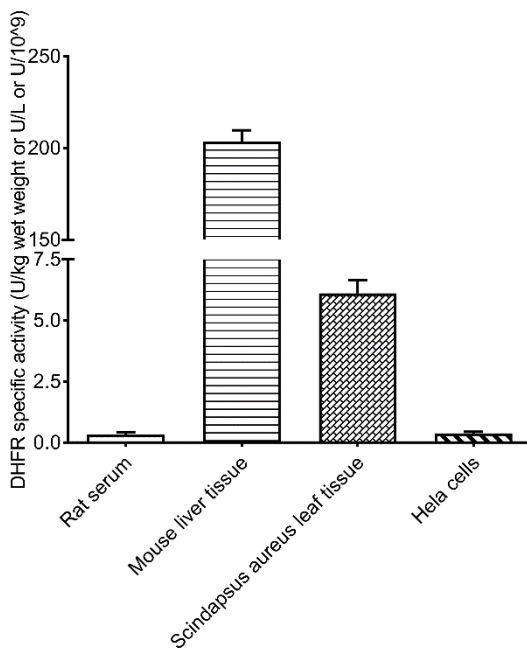
例如检测10%小鼠肝样本(数据仅供参考):

取20 μL 10%小鼠肝样本匀浆上清液加入到酶标板中, 按操作表操作, 结果如下: 测定孔 A_1 平均OD值为1.437, 测定孔 A_2 平均OD值为1.013, $\Delta A_{\text{测}} = 1.437 - 1.013 = 0.424$ 。对照孔 A_1 平均OD值为1.250, 对照孔 A_2 平均OD值为1.037, $\Delta A_{\text{对}} = 1.250 - 1.037 = 0.213$ 。空白孔 A_1 平均OD值为0.902, 空白孔 A_2 平均OD值为0.878, $\Delta A_{\text{空}} = 0.902 - 0.878 = 0.024$ 。计算结果为:

DHFR 活力
(U/kg wet weight) $= (0.424 - 0.213 - 0.024) \times 0.2 \div 6220 \div 0.6 \div 0.02 \div 25 \div$

$$\frac{0.1}{0.9} \times 10^6 = 180.39 \text{ U/Kg wet weight}$$

按说明书操作, 测定大鼠血清(加样量20 μL)、小鼠肝样本(10%组织匀浆, 加样量20 μL)、绿萝叶组织(10%组织匀浆, 加样量20 μL)、Hela细胞(1×10^6 个, 加样量20 μL)的DHFR活力(如下图所示):



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

