（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-K860-M

产品规格：48T(46 samples)/96T(94 samples)

检测仪器：酶标仪(580-620 nm)

Elabscience®脯氨酸脱氢酶(ProDH)比色法测试盒

Proline Dehydrogenase (ProDH) Activity 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动植物组织样本中的脯氨酸脱氢酶(ProDH)的酶活。

检测原理

脯氨酸脱氢酶(Proline dehydrogenase, ProDH)催化脯氨酸过程中产生的氢可通过电子受体还原显色剂，使显色剂颜色变浅，通过测定 600 nm 处吸光度的下降速率即可表征 ProDH 的活性。

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，植物组织样本推荐使用考马斯亮蓝法(货号：E-BC-K168-M)，动物组织样本不需要测定总蛋白浓度。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size1) (48 T)	规格 2 (Size2) (96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 A (Extract Solution A)	55 mL×1 瓶	55 mL×2 瓶	-20ºC 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	提取液 B (Extract Solution B)	1 mL×1 支	1 mL×2 支	-20ºC 避光保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	显色剂 (Chromogenic Agent)	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20ºC 避光保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 (Substrate)	0.1 mL×1 支	0.2 mL×1 支	-20ºC 避光保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	反应液 (Reaction Solution)	10 mL×1 瓶	20 mL×1 瓶	-20ºC 避光保存 6 个月
	96 孔酶标板	48 孔×1 块	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：低温离心机、酶标仪(580-620 nm，最佳检测波长 600 nm)、超声仪(功率 20%)。

试剂准备

① 检测前，试剂二、四置于冰盒避光待用，试剂盒其余试剂平衡至25ºC，试剂四可分装-20ºC避光保存。

② 试剂三工作液的配制：

取一支试剂三加10 mL的双蒸水，超声10 min溶解待用(若没有超声仪可涡旋混匀至完全溶解)，在-20℃避光可保存5天。

③ 显色工作液的配制：

将试剂五：试剂三工作液按体积比= 69: 25配制，在2-8ºC避光可保存2天(使用前避光超声10 min)。

④ 反应工作液的配制：

将显色工作液：试剂四按体积比= 300: 1配制，避光待用，现配现用，当天有效。

样本准备

① 样本处理

组织样本：按照组织样本质量(g): 提取液A体积(mL): 提取液B体积(mL) = 10: 89: 1的比例进行匀浆处理。4ºC，10000 × g离心10 min，取上清置于冰上待测，当天检测有效。

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：0.04-1.10 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%绿叶组织	不稀释	10%蒜组织	不稀释
10%小鼠肺组织	不稀释		

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

用超声处理将试剂三完全溶解于双蒸水中，若没有超声仪可涡旋混匀至完全溶解。

操作步骤

① 空白孔：取 40 μL 双蒸水加入相应的酶标孔中；

测定孔：取 40 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。

② 向步骤①中各孔加入 200 μL 反应工作液。

③ 振板 5 s，37°C 孵育 15 min，酶标仪于 600 nm 波长测定各孔 OD 值 A_1。继续在 37°C 下孵育 60 min，振板 5 s，酶标仪于 600 nm 波长测定各孔 OD 值 A_2。

操作表

	空白孔	测定孔
双蒸水(μL)	40	--
待测样本(μL)	--	40
反应工作液(μL)	200	200
振板 5 s，37°C 孵育 15 min，酶标仪于 600 nm 波长测定各孔 OD 值 A_1。37°C 孵育 60 min，振板 5 s，酶标仪于 600 nm 波长测定各孔 OD 值 A_2。		

本试剂盒检测组织时，需测定总蛋白浓度，植物组织推荐使用考马斯亮蓝法(货号：E-BC-K168-M)。动物组织不需测定总蛋白浓度。

结果计算

植物组织样本中脯氨酸脱氢酶（ProDH）酶活计算公式：

定义：37°C 条件下，每克组织蛋白在每升反应体系中每分钟消耗 1 mmol DCPIP 所需要酶活为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH 活力 (U/gprot)} = (\Delta A_{样} - \Delta A_{空}) \times V_{总} \times f \div \varepsilon \div d \div V_{样} \div T \div C_{pr} \times 1000^*$$

动物组织样本中脯氨酸脱氢酶（ProDH）酶活计算公式：

定义：37°C 条件下，每克组织在每升反应体系中每分钟消耗 1 mmol DCPIP 所需要酶活为一个酶活力单位。

$$\text{ProDH 活力 (U/g wet weight)} = (\Delta A_{样} - \Delta A_{空}) \times V_{总} \times f \div \varepsilon \div d \div V_{样} \div T \div W \times 1000^*$$

注解：

$\Delta A_{样}$：$\Delta A_{样} = A_1 - A_2$

$\Delta A_{空}$：$\Delta A_{空} = A_1 - A_2$

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

$V_{总}$：反应体系总体积，0.24 mL

$V_{样}$：加入样本体积，0.04 mL

T：反应时间，60 min

C_{pr}：待测样本的蛋白浓度(gprot/L)

ε：摩尔吸光系数，18.7 L/mol/cm

d：光径，0.6 cm

W：样本质量，0.1 g

1000*：1 mol/L = 1000 mmol/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.04-1.10 U/L	**批间差**	8.9-10.0%
灵敏度	0.04 U/L	**批内差**	3.0-3.9%
稀释回收率	95-100%		

附录2 实例分析

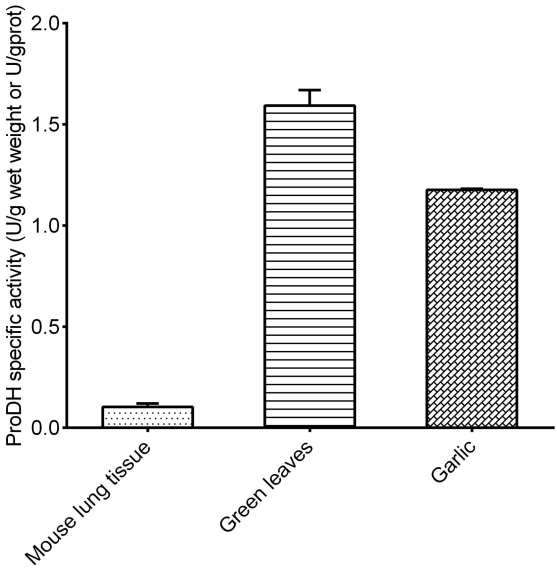
例如检测绿叶植物组织(数据仅供参考)：

取40 μL 10 %绿叶匀浆上清液，按操作表操作，结果如下：空白孔A_1值为0.604，A_2值为0.587，$\Delta A_{空} = 0.604 - 0.587 = 0.017$；测定孔$A_1$为0.679，$A_2$为0.610，$\Delta A_{样} = 0.679 - 0.610 = 0.069$，10 %绿叶组织匀浆蛋白浓度为0.29 gprot/L，计算结果为：

$$\text{ProDH活力(U/gprot)} = (0.069 - 0.017) \times 0.24 \div 18.7 \div 0.6 \div 0.04 \div 60 \div 0.29 \times 1000$$

$$= 1.60 \text{ U/gprot}$$

按说明书操作，测定小鼠肺组织（加样量40 μL）、绿叶组织(10 %组织匀浆蛋白浓度0.29 gprot/L，加样量40 μL)、蒜组织(10 %组织匀浆蛋白浓度0.87 gprot/L，加样量40 μL)）中的ProDH活力(如下图)：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本测值太小	样本浓度不够	增加样本浓度 10-20 %
	反应工作液放置过久	现配现用
	溶解后的试剂三析出	试剂三超声后使用

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同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。