

(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-K848-M

产品规格: 96T(40 samples)

检测仪器: 酶标仪(500 – 540 nm)

Elabscience®精氨酸酶比色法测试盒

Arginase 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组织和细胞样品中精氨酸酶的酶活。

检测原理

精氨酸酶(Arginase)是尿素循环的关键酶。精氨酸酶在肿瘤、心血管等疾病中扮演着重要角色。本试剂盒的作用原理是精氨酸酶催化底物分解,产生尿素,尿素与显色剂反应生成显色物质,该产物的最佳检测波长为 520 nm,通过检测单位时间内显色物质生成量,可计算样品中的精氨酸酶活大小。

本试剂盒检测组织或细胞样本时,需测定总蛋白浓度,推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式(Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	10 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	5 mmol/L 标准品 (5 mmol/L Standard)	1.8 mL×2 支	-20°C 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	显色剂 A (Chromogenic Agent A)	50 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 B (Chromogenic Agent B)	25 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	显色储备液 (Chromogenic Stock Solution)	0.6 mL×1 支	-20°C 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	盐溶液 (Saline Solution)	0.5 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	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(波长 500-540 nm，最佳检测波长为 520 nm)、水浴锅、37°C 恒温培养箱

试剂：生理盐水(0.9% NaCl)、去离子水

试剂准备

① 检测前，所有试剂需要平衡至25°C。

② 试剂四工作液的配制：

取一支试剂五，将试剂五全部倒入试剂四中，并混匀，未用完试剂可-20°C 避光保存一个月。

③ 显色剂工作液的配制：

按试剂三：试剂四工作液=2：1 的体积混匀。例如，取 12 mL 试剂三，加入 6 mL 试剂四工作液，混匀，即得到显色剂工作液。按需配制，配制好的显色剂工作液可-20°C 避光保存 4 天。

④ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	0	1	2	2.5	3	3.5	4	5
5 mmol/L 标准品(μ L)	0	40	80	100	120	140	160	200
去离子水(μ L)	200	160	120	100	80	60	40	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：按组织样本质量(g)：生理盐水(0.9% NaCl)体积(mL)=1: 9的比例进行匀浆，例如，0.1 g小鼠肺组织，加入0.9 mL生理盐水（0.9% NaCl）匀浆。4°C，10000 × g离心10 min后取上清待测，需留取部分上清进行蛋白浓度测定。

细胞样本：取 1×10^6 个细胞离心后弃上清，每次加入 200 μ L 生理盐水

(0.9% NaCl), 清洗三次。清洗完成后再加入 200 μ L 生理盐水(0.9% NaCl)匀浆处理, 4 $^{\circ}$ C, 10000 \times g 离心 10 min 后取上清待测, 需留取分上清液进行蛋白浓度测定。

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: 0.07-23.40 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%小鼠肾组织	不稀释	1 \times 10 ⁶ 个 293T 细胞	不稀释
10%小鼠脑组织	不稀释	1 \times 10 ⁶ 个 HepG2 细胞	不稀释
10%小鼠心组织	不稀释	10%小鼠肝组织	20-120

注: 稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

实验关键点

- ① 根据不同样品中精氨酸酶的酶活, 选择合适的稀释倍数。样本中尿素含量过高, 95 $^{\circ}$ C 水浴后溶液呈橙黄色, 此时需增大稀释倍数。
- ② 95 $^{\circ}$ C 水浴结束后需冷却至室温, 再加入微板检测。

操作步骤

- ① 样本前处理：试剂六与待测样品体积比例=1：100，混匀。
- ② 标准管：向相应 EP 管中加入 25 μL 不同浓度标准品；
测定管：向相应 EP 管中加入 25 μL 待测样本；
对照管：向相应 EP 管中加入 25 μL 待测样本。
- ③ 向测定管中加入 75 μL 试剂一，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min。
- ④ 向各管中加入 450 μL 显色剂工作液。
- ⑤ 标准管和对照管中加入 75 μL 试剂一。
- ⑥ 将各管放入 95 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中，水浴 10 min，待各管冷却至室温后，每管吸取 200 μL 加入到酶标板中，使用酶标仪检测各孔 520 nm 波长处的 OD 值。

操作表

试剂六与待测样品体积比例=1：100，混匀			
	标准管	测定管	对照管
标准品(μL)	25	--	--
样本(μL)	--	25	25
试剂一(μL)	--	75	--
37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 15 min			
显色剂工作液(μL)	450	450	450
试剂一(μL)	75	--	75
将各管放入 95 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中，水浴 10 min，待各管冷却至室温后，每管吸取 200 μL 加入到酶标板中，使用酶标仪检测各孔 520 nm 波长处的 OD 值。			

本试剂盒检测组织或细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

组织与细胞样本中精氨酸酶活力计算公式：

定义：37°C 条件下，每克样本蛋白每分钟催化底物生成 1 mmol 的尿素所需要的酶量为一个酶活单位。

$$\text{精氨酸酶(ARG)活力} = (\Delta A_{\text{测}} - b) \div a \div t \div C_{\text{pr}} \times f$$

(U/gprot)

注解：

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标准曲线的斜率

b: 标准曲线的截距

$\Delta A_{\text{测}}$: 样本绝对 OD 值, $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测}} - A_{\text{对}}$

t: 反应时间, 15 min

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr} : 待测样本的蛋白浓度, gprot/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

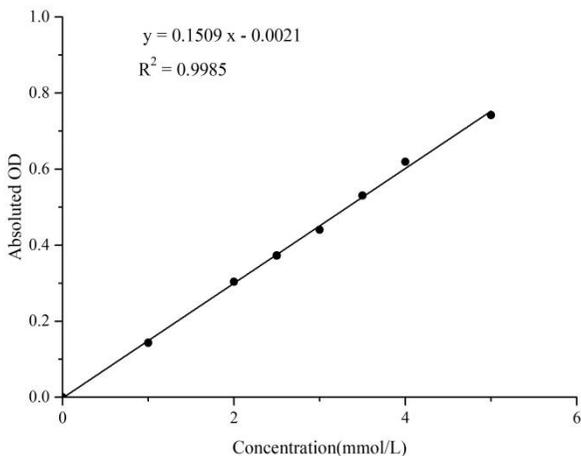
检测范围	0.07-23.40 U/L	批间差	7.2-10%
灵敏度	0.07 U/L	批内差	2.5-4.8%
稀释回收率	100-105%		

2. 标准曲线 (数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量25 μ L, 按照操作步骤进行实验, OD值如下表所示:

标准品浓度 (mmol/L)	0	1	2	2.5	3	3.5	4	5
OD 值	0.053	0.194	0.355	0.423	0.484	0.581	0.666	0.786
	0.052	0.198	0.358	0.428	0.502	0.585	0.678	0.803
平均 OD 值	0.052	0.196	0.356	0.425	0.493	0.583	0.672	0.794
绝对 OD 值	0	0.143	0.304	0.373	0.440	0.530	0.619	0.742

② 绘制标曲(如下图):



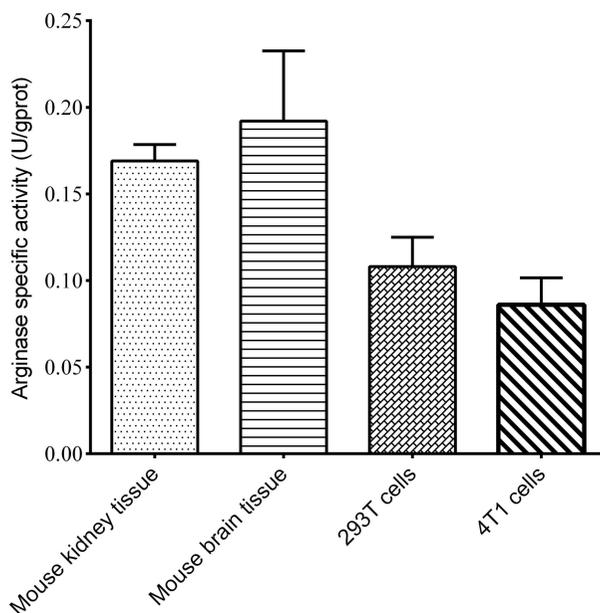
附录2 实例分析

例如检测10%小鼠肝组织(数据仅供参考):

取25 μL 稀释倍数为100的10%小鼠肝组织上清液,按操作表操作,结果如下:标准曲线: $y = 0.1401x - 0.0094$, 测定孔平均值OD值为0.373, 对照孔平均OD值为0.081, $\Delta A_{\text{测}} = 0.373 - 0.081 = 0.292$, 10%小鼠肝组织匀浆蛋白浓度为3.18 gprot/L计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{精氨酸酶活力(U/gprot)} &= (0.373 - 0.081 + 0.0094) \div 0.1401 \div 15 \div 3.18 \times 100 \\ &= 4.51 \text{ U/gprot} \end{aligned}$$

按说明书操作,测定小鼠肾组织(10%组织匀浆蛋白浓度3.28 gprot/L, 加样量25 μL)、测定小鼠脑组织(10%组织匀浆蛋白浓度1.40 gprot/L, 加样量25 μL)、293T细胞(1×10^6 个细胞匀浆蛋白浓度0.26 gprot/L, 加样量为25 μL)、4T1细胞(1×10^6 个细胞匀浆蛋白浓度0.26 gprot/L, 加样量为25 μL), 精氨酸酶活性(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本 OD 值过高	样本精氨酸酶酶活过高	稀释样本至合适浓度, 确保样本 OD 值在标准曲线范围内。
对照孔 OD 值过高	提前加入试剂一	在加入试剂一之前, 需先加入显色剂工作液。

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。

