

(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℃ 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℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	显色剂 A (Chromogenic Agent A)	50 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 B (Chromogenic Agent B)	25 mL×1 瓶	-20℃ 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℃ 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	盐溶液 (Saline Solution)	0.5 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板	
	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℃ 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℃。

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℃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℃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( $\mu$ L)	0	40	80	100	120	140	160	200
去离子水( $\mu$ 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℃, 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  $1 \times 10^6$  个细胞离心后弃上清, 每次加入 200  $\mu$ L 生理盐水

(0.9% NaCl), 清洗三次。清洗完成后再加入 200  $\mu$ 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 <sup>6</sup> 个 293T 细胞	不稀释
10%小鼠脑组织	不稀释	1 $\times$ 10 <sup>6</sup> 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  $\mu\text{L}$  不同浓度标准品；  
测定管：向相应 EP 管中加入 25  $\mu\text{L}$  待测样本；  
对照管：向相应 EP 管中加入 25  $\mu\text{L}$  待测样本。
- ③ 向测定管中加入 75  $\mu\text{L}$  试剂一，37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min。
- ④ 向各管中加入 450  $\mu\text{L}$  显色剂工作液。
- ⑤ 标准管和对照管中加入 75  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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( $\mu\text{L}$ )	25	--	--
样本( $\mu\text{L}$ )	--	25	25
试剂一( $\mu\text{L}$ )	--	75	--
37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 15 min			
显色剂工作液( $\mu\text{L}$ )	450	450	450
试剂一( $\mu\text{L}$ )	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 $\mu\text{L}$ 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℃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。

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

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

$C_{\text{pr}}$ : 待测样本的蛋白浓度, gprot/L

## 附录1 关键数据

### 1. 技术参数

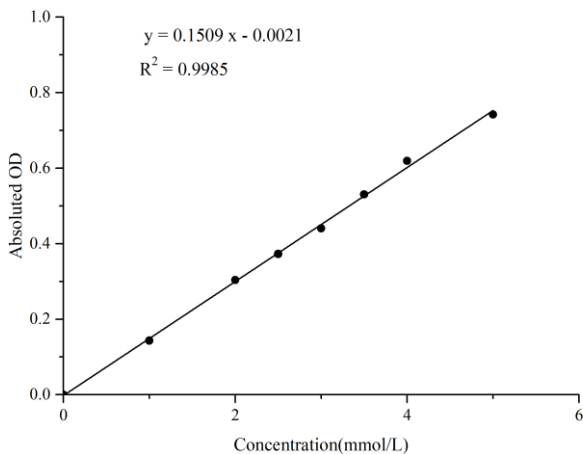
检测范围	0.07-23.40 U/L	批间差	7.2-10%
灵敏度	0.07 U/L	批内差	2.5-4.8%
稀释回收率	100-105%		

### 2. 标准曲线 (数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量25  $\mu$ 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):



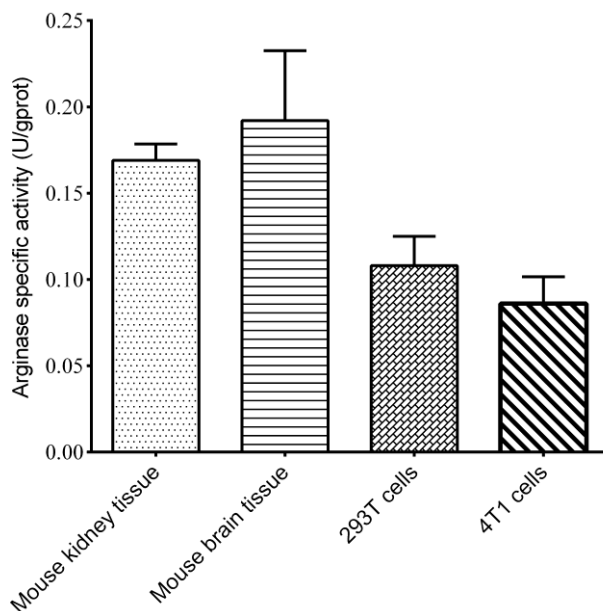
## 附录2 实例分析

例如检测10%小鼠肝组织(数据仅供参考):

取25  $\mu\text{L}$ 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  $\mu\text{L}$ )、测定小鼠脑组织(10%组织匀浆蛋白浓度1.40 gprot/L, 加样量25  $\mu\text{L}$ )、293T细胞( $1 \times 10^6$ 个细胞匀浆蛋白浓度0.26 gprot/L, 加样量为25  $\mu\text{L}$ )、4T1细胞( $1 \times 10^6$ 个细胞匀浆蛋白浓度0.26 gprot/L, 加样量为25  $\mu\text{L}$ ), 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。





