

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：GBQ233

产品规格：96T(40 samples)

检测仪器：酶标仪(430-470 nm)

Elabscience®醛酮还原酶(ARKs)比色法试剂盒

Aldo-Keto Reductase (ARKs) 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血清(浆)、动物组织中醛酮还原酶(ARKs)的酶活。

检测原理

醛酮还原酶(Aldo-keto reductase, ARKs)分布于原核生物和真核生物中,存在多种亚型。ARKs 可催化 NADPH 依赖性的羰基还原反应,生成相应的醇。研究表明, ARKs 与多种癌症相关。本试剂盒的作用原理是底物被 ARKs 催化,生成产物与显色剂反应产生的显色物质在 450 nm 处有特征吸收峰,通过检测单位时间内显色物质生成量,可计算样品中的 ARKs 酶活大小。

本试剂盒检测组织样本时,需测定总蛋白浓度,推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 GBQ162)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)	20 mL×1 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	0.2 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	标准品 (Standard)	粉剂×1 支	-20℃ 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(最佳检测波长为 450 nm)、37℃恒温培养箱

试剂: 生理盐水(0.9% NaCl)、双蒸水

试剂准备

① 检测前，所有试剂需要平衡至25℃。

② 显色剂工作液的配制：

按试剂一：试剂二体积比=160: 1 混匀。例如，取 4 mL 试剂一，加入 25 μ L 试剂二，混匀，即得到显色剂工作液，按此方法配制的显色剂工作液可供约 22 个孔添加。按需配制，需避光保存，10 min 内使用。

③ 500 μ mol/L 标准品的配制：

取一支试剂三，加入 2 mL 的双蒸水，充分溶解并混匀，得到 500 μ mol/L 的标准品。按需配制，需避光保存，2 h 内使用。

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(μ mol/L)	0	100	200	250	300	350	400	500
500 μ mol/L 标准品(μ L)	0	40	80	100	120	140	160	200
双蒸水(μ L)	200	160	120	100	80	60	40	0

样本准备

① 样本处理

血清(浆)样本：直接测定。

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。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。

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：0.05 - 45.00 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%小鼠肾组织	不稀释	10%小鼠肝组织	不稀释
10%小鼠脑组织	不稀释	10%小鼠肺组织	不稀释
10%小鼠心组织	不稀释	小鼠血浆	不稀释

注：稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

实验关键点

显色剂工作液的使用和配制过程中注意避光，10 min 内使用。

操作步骤

- ① 向标准孔中加入 20 μL 不同浓度标准品；
向测定孔、对照孔中加入 20 μL 样本。
- ② 向标准孔、测定孔中加入 180 μL 显色剂工作液；
向对照孔中加入 180 μL 试剂一。
- ③ 37℃下避光孵育 30 min，酶标仪于 450 nm 处检测各孔的 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔	对照孔
标准品(μL)	20	--	--
样本(μL)	--	20	20
试剂一(μL)	--	--	180
显色剂工作液(μL)	180	180	--
37℃ 下避光孵育 30 min，酶标仪于 450 nm 处检测各孔的 OD 值。			

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 GBQ162)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

组织样本中醛酮还原酶(ARKs)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 μmol 的 NADPH 所需要的酶量为一个酶活单位。

$$\text{ARKs 活力 (U/gprot)} = (\Delta A_{\text{测}} - b) \div a \div t \div C_{\text{pr}} \times f \div 1000$$

血清(浆)中醛酮还原酶(ARKs)活力计算公式:

定义: 37℃条件下, 每升血清样本每分钟催化底物生成 1 μmol 的 NADPH 所需要的酶量为一个酶活单位。

$$\text{ARKs 活力 (U/L)} = (\Delta A_{\text{测}} - b) \div a \div t \times f \div 1000$$

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

$\Delta A_{\text{测}}$: 测定孔 OD 值-对照孔 OD 值, $A_{\text{测}} - A_{\text{对}}$

t: 反应时间, 30 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

1000: 单位换算, 1 mmol/L=1000 μmol/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

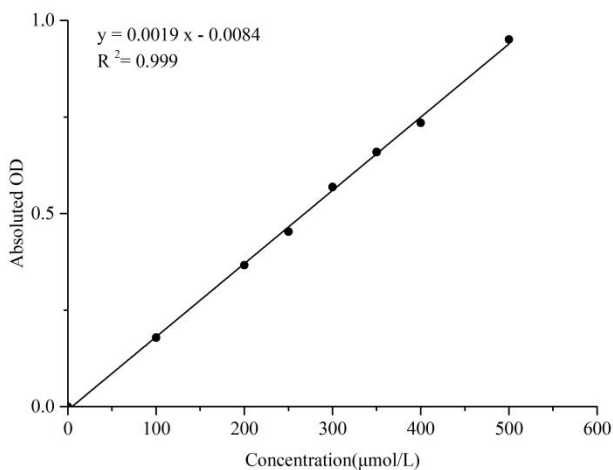
检测范围	0.05-45.00 U/L	批间差	7.1-10%
检测灵敏度	0.05 U/L	批内差	1.9-4.8%
稀释回收率	94-105%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20 μL , 按照操作步骤进行实验, OD值如下表所示:

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	100	200	250	300	350	400	500
OD 值	0.054	0.234	0.422	0.51	0.635	0.688	0.795	1.016
	0.053	0.231	0.418	0.504	0.61	0.738	0.782	0.993
平均 OD 值	0.054	0.233	0.420	0.507	0.623	0.713	0.789	1.005
绝对 OD 值	0	0.179	0.367	0.454	0.569	0.660	0.735	0.951

② 绘制标准曲线(如下图):



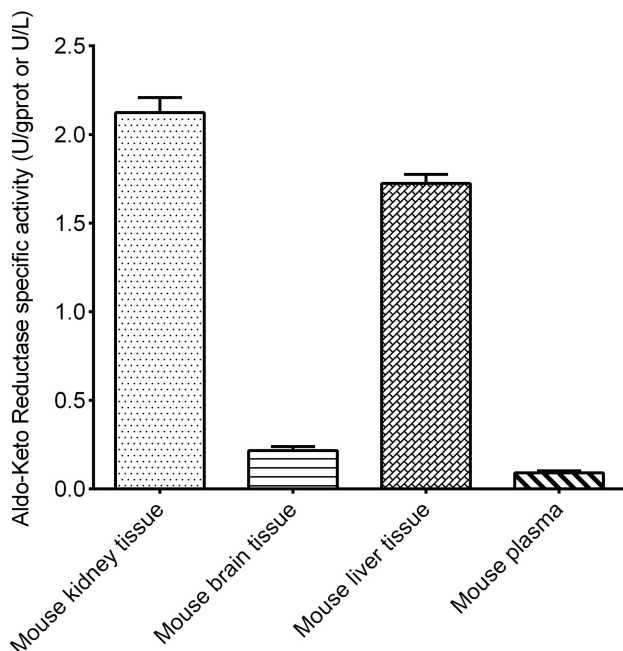
附录2 实例分析

例如检测10%小鼠肾组织(数据仅供参考):

取10%小鼠肾组织匀浆上清液20 μL , 按操作表操作, 结果如下: 标准曲线: $y = 0.0014x - 0.0154$, 测定孔平均值 $A_{\text{测}} = 0.885$, 对照孔平均 $A_{\text{对}} = 0.248$, $\Delta A_{\text{测}} = 0.885 - 0.248 = 0.637$, 10%小鼠肾组织匀浆蛋白浓度为7.32 gprot/L计算结果为:

$$\begin{aligned}\text{ARKs活力(U/gprot)} &= (0.885 - 0.248 + 0.0154) \div 0.0014 \div 30 \div 7.32 \\ &= 2.122 \text{ U/gprot}\end{aligned}$$

按说明书操作, 测定小鼠肾组织(10%组织匀浆蛋白浓度7.32 gprot/L, 加样量20 μL)、小鼠脑组织(10%组织匀浆蛋白浓度4.29 gprot/L, 加样量20 μL)、小鼠肝组织(10%组织匀浆蛋白浓度7.32 gprot/L, 加样量20 μL)、小鼠血浆(加样量20 μL)中ARKs活性(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
背景值过高	底物与显色液反应	显色工作液现配现用，严格避光。

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。

