

(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-K850-M

产品规格: 96T(40 samples)

检测仪器: 酶标仪(510-530 nm)

Elabscience® L-精氨酸 (L-Arg) 比色法测试盒

L-Arginine (L-Arg) 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、血浆、尿液以及动植物组织样本中的 L-精氨酸 (L-Arg) 的含量。

检测原理

精氨酸 (Arg) 是人体内必需的一种氨基酸，在食物当中也可以摄取。天然精氨酸为 L-型，精氨酸呈碱性，易与酸反应形成盐。精氨酸是鸟氨酸循环的中间代谢物，能促使氨转变成成为尿素，从而降低血氨含量。

精氨酸在酶的作用下生成尿素，尿素在强酸性条件通过煮沸可与脲试剂进行络合，该络合物在 520 nm 有最大吸收峰，通过测定 OD 值大小判断精氨酸含量。

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 A (Buffer Solution A)	50 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 B (Buffer Solution B)	1.8 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	酶试剂 A (Enzyme Reagent A)	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	酶试剂 B (Enzyme Reagent B)	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	显色剂 A (Chromogenic Agent A)	24 mL×1 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	显色剂 B (Chromogenic Agent B)	24 mL×1 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	1 mmol/L 标准品 (1 mmol/L Standard)	1 mL×2 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(510-530 nm，最佳检测波长 520 nm)、60°C 和 100°C 水浴锅

试剂：生理盐水 (0.9% NaCl)

耗材：10 KD 超滤管

试剂准备

① 检测前，试剂三置于冰盒上待用，其他试剂平衡至室温。

② 试剂三工作液的配制：

取一支试剂三，加入0.7 mL试剂二，溶解混匀，配制好的工作液置于冰盒上待用，未用完部分-20 °C避光保存7天。

③ 试剂三反应工作液的配制：

将试剂一与试剂三工作液按照2：1体积比进行混合，配制好的工作液置于冰盒上避光保存，该工作液1天内使用有效。

④ 试剂四工作液的配制：

取一支试剂四，用2 mL双蒸水溶解，配制好的工作液置于冰盒上待用，未用完部分-20 °C避光保存3天。

⑤ 显色工作液配制：

试剂五与试剂六按照1：1体积比进行配制，配制好的工作液当天使用完毕。

⑥ 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	0.1	0.2	0.3	0.5	0.6	0.8	1
1 mmol/L 标准品(μL)	0	20	40	60	100	120	160	200
试剂一(μL)	200	180	160	140	100	80	40	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：称量0.1 g组织样本用0.9 mL生理盐水(0.9% NaCl)匀浆，12000 × g离心10 min，取样本上清，将样本上清（每份样本上清不多于300 μL）与试剂四工作液按照4: 1体积比混匀，置于37 ℃孵育20 min。孵育完毕将孵育后的样本于4 ℃，12000 × g离心10 min，取上清于10 KD超滤管，4 ℃，12000 × g离心15 min，下层滤液待用。

血清(浆)、尿液样本：将样本（每份样本不多于300 μL）与试剂四工作液按照4: 1体积比混匀，置于37 ℃孵育20 min。孵育完毕将孵育后的样本于4 ℃，12000 × g离心10 min，取上清于10 KD超滤管，4 ℃，12000 × g离心15 min，下层滤液待用。

注：样本超滤前，每份样本上清或者液体样本不多于300 μL。

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：0.008-1.00 mmol/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	1-2	10 %大鼠肾组织	1-2
10%大鼠心组织	1-2	10 %大鼠肺组织	1-2
胎牛血清	1-2	柑橘	1-2
人血清	1-2	人血浆	1-2

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

- ① 煮沸过程避免外界水进入反应体系。
- ② 产物有刺激性气味，转移至酶标板过程需在通风橱进行。

操作步骤

- ① 标准管：取 40 μL 不同浓度的标准品溶液加入相应的标准管中。
对照管：取 40 μL 待测样本加入相应的对照管中。
测定管：取 40 μL 待测样本加入相应的测定管中。
- ② 向步骤①中标准管和测定管中加入 60 μL 试剂三反应工作液；
向步骤①中对照管加入 60 μL 试剂一。
- ③ 混匀，60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h。
- ④ 向步骤③各管中加入 400 μL 显色工作液，98 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 30 min。注：煮沸过程可进行 1-2 次排气或在管口上扎孔，要避免外部水进入反应体系。
- ⑤ 冷却至室温，取 200 μL 冷却液至酶标板中，酶标仪 520 nm 波长下检测各孔的吸光度值。

操作表

	标准管	对照管	测定管
不同浓度标准品溶液(μL)	40	--	--
待测样本(μL)	--	40	40
试剂三反应工作液(μL)	60	--	60
试剂一(μL)	--	60	--
混匀，60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h			
显色工作液(μL)	400	400	400
98 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 30 min			
冷却至室温，取 200 μL 冷却液至酶标板中，酶标仪 520 nm 波长下检测各孔的吸光度值。			

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

① 组织样本：

$$\frac{\text{L-Arg 含量}}{(\text{mmol/kg wet weight})} = (\Delta A_{520} - b) \div a \div (m \div V) \div 0.8^* \times f$$

② 血清(浆)、尿液样本：

$$\frac{\text{L-Arg 含量}}{(\text{mmol/L})} = (\Delta A_{520} - b) \div a \div 0.8^* \times f$$

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: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔA_{520} : 样本的绝对 OD 值 (测定孔 OD 值-对照孔 OD 值)

m: 匀浆样本质量, g

V: 匀浆液体积, mL

0.8*: 试剂四工作液对样本的稀释倍数

f: 样本的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

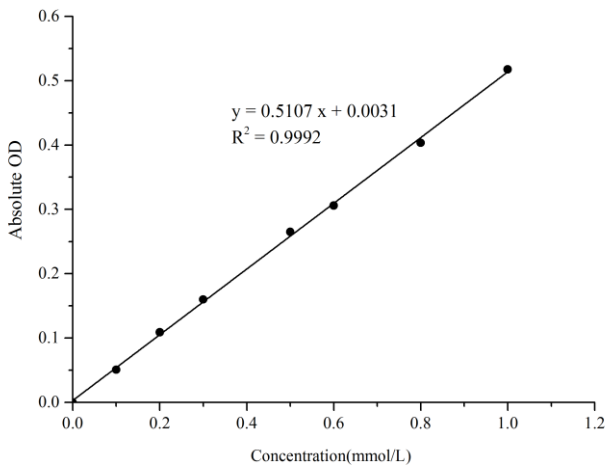
检测范围	0.008-1 mmol/L	批间差	6-8 %
灵敏度	0.008 mmol/L	批内差	1.8-3.8 %
回收率	94-98 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量40 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	0.1	0.2	0.3	0.5	0.6	0.8	1
OD 值	0.064	0.115	0.173	0.224	0.330	0.370	0.464	0.579
	0.064	0.115	0.173	0.224	0.328	0.37	0.471	0.584
平均 OD 值	0.064	0.115	0.173	0.224	0.329	0.370	0.468	0.582
绝对 OD 值	0.000	0.051	0.109	0.160	0.265	0.306	0.404	0.518

② 绘制标曲(如下图):



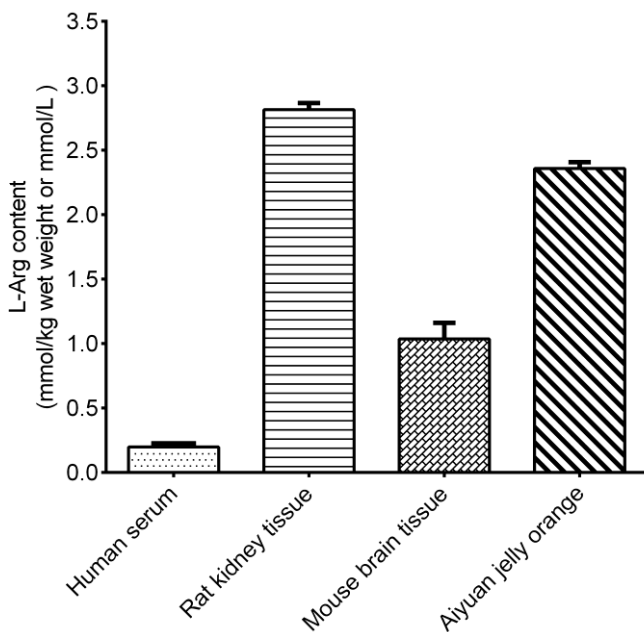
附录2 实例分析

例如检测人血清样本(数据仅供参考):

取处理后的待测人血清稀释2倍, 40 μL , 按说明书操作, 结果如下: 标准曲线: $y = 0.5107x + 0.0031$, 对照孔OD值为0.081, 测定孔OD值为0.135, $\Delta A_{520} = 0.135 - 0.081 = 0.054$, 计算结果为:

$$\text{L-Arg (mmol/L)} = (0.054 - 0.0031) \div 0.5107 \div 0.8 \times 2 = 0.250 \text{ mmol/L}$$

按说明书操作, 测定人血清(稀释2倍, 加样量40 μL)、大鼠肾组织(10%组织匀浆稀释2倍, 加样量40 μL)、小鼠脑组织(10%组织匀浆稀释2倍, 加样量40 μL)、橙子果肉组织(10%组织匀浆稀释2倍, 加样量40 μL)中的L-Arg含量(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本测不出值	样本未用试剂一进行稀释	样本加入前一定要用试剂一进行稀释

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。

