(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-K791-M

产品规格: 48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器: 酶标仪(545-565 nm)

Elabscience®甘油激酶(GK)比色法测试盒 Glycerol Kinase (GK) Acitivity 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动物组织中的甘油激酶(GK)的酶活。

检测原理

甘油激酶(Glycerol kinase, GK)是甘油代谢中的限速酶,该酶的缺乏将直接导致细胞不能利用甘油。

本试剂盒通过在磷酸甘油氧化酶的作用下产生过氧化氢,过氧化氢与显色剂的反应在 555 nm 处有最大吸收峰。通过测定 555 nm 处的增加速率即可得出 GK 的酶活力大小。

本试剂盒检测动物组织样本时,需测定总蛋白浓度,推荐使用本公司BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格1	规格 2	保存方式
. ,		(Size 1)(48 T)	(Size 2)(96 T)	(Storage)
试剂一	工作液	6 mL×1 瓶	12 mL×1 瓶	-20℃ 避光
(Reagent 1)	(Working Solution)	O IIIL × 1 /IIC	12 IIIL ^ 1 //L	保存6个月
试剂二	终止液	6 mL×1 瓶	12 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6
(Reagent 2)	(Stop Solution)	O IIIL ^ I 71A,	12 IIIL ^ 1 71A,	个月
试剂三	标准品	粉剂×1瓶	粉剂×1瓶	-20℃ 避光
(Reagent 3)	(Standard)	777 717 ^ 1 71A	777 711 ^ 1 71A.	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: 酶标仪(波长 545-565 nm, 最佳检测波长 555 nm)

试剂: 生理盐水(0.9% NaCl)

试剂准备

① 检测前, 试剂盒中试剂平衡至25°C, 试剂一可分装-20°C可保存6个月。

② 4.25 mmol/L标准品的配制:

取一瓶试剂三,用5 mL双蒸水溶解混匀,未使用完试剂-20°C保存1个月。

③ 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	0.85	1.28	1.70	2.13	2.98	3.40	4.25
4.25 mmol/L 标准品(μL)	0	40	60	80	100	140	160	200
双蒸水(μL)	200	160	140	120	100	60	40	0

样本准备

① 样本处理

组织样本:按照组织样本质量(g): 生理盐水(0.9% NaCl)体积(mL)=1: 9 的比例匀浆, 4°C, 10000×g离心10 min, 取上清液, 置于冰上待测, 当天检测有效。留取部分上清, 进行蛋白浓度测定。

③ 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:9.28-170.00 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%小鼠肝组织	不稀释	10%小鼠肾组织	不稀释
10%小鼠小肠组织	不稀释		

注:稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

实验关键点

试剂三在吸打过程中容易产生泡沫, 建议在使用移液枪时小心吸打。

操作步骤

- ① 标准孔: 取 10 μL 不同浓度的标准品溶液,分别加入相应酶标孔中。测定孔: 取 10 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①中各孔加入 100 µL 试剂一。
- ③ 振板 5 s, 立即使用酶标仪于 555 nm 检测测定孔的 OD 值 A₁。
- ④ 37°C 避光孵育 25 min, 向步骤③中各孔加入 100 μL 试剂二, 使用酶标仪于 555 nm 检测各孔的 OD 值, 记为 A₂。

操作表

	标准孔	测定孔			
不同浓度标准品溶液(μL)	10				
待测样本(μL)	-	10			
试剂一(μL)	100	100			
振板 5 s, 立即使用酶标仪于 555 nm 检测测定孔的 OD 值 A ₁ , 37°C 避光					
孵育 25 min。					
试剂二(μL) 100 100					
使用酶标仪于 555 nm 检测各孔的 OD 值,记为 A2。					

本试剂盒检测组织样本时,需测定总蛋白浓度,动物组织样本推荐使用 BCA 法(货号: E-BC-K318-M)。

结果计算

标准品拟合曲线: y = ax + b

组织样本中甘油激酶(GK)酶活计算公式:

定义: 37°C 条件下, 每克组织蛋白在反应体系中每分钟生成 1 μmol 3-磷酸甘油定义为一个酶活力单位。

$$\frac{GK}{(U/gprot)}$$
 = $(\Delta A - b) \div a \div C_{pr} \times f \div T \times 1000*$

注解:

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值,标准曲线以标准孔 A₂值进行拟合)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔA: 样本的绝对 **OD** 值(**A**₂ - **A**₁)

C_{pr}: 匀浆后样本蛋白浓度, gprot/L

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

T: 反应时间, 25 min

1000*: 1 mmol/L=1000 μmol/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

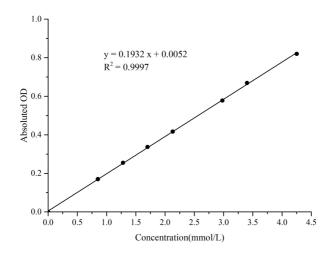
检测范围	9.28-170.00 U/L	批间差	6.5-8.0%
灵敏度	9.28 U/L	批内差	3.0-3.6%
稀释回收率	96-100%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度标准品加样量10 µL, 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	0.85	1.28	1.70	2.13	2.98	3.40	4.25
OD /#	0.046	0.215	0.300	0.383	0.463	0.621	0.712	0.865
OD 值	0.046	0.216	0.302	0.383	0.462	0.626	0.718	0.866
平均 OD 值	0.046	0.216	0.301	0.383	0.463	0.624	0.715	0.866
绝对 OD 值	0	0.170	0.255	0.337	0.417	0.578	0.669	0.820

②绘制标曲(如下图):



附录2 实例分析

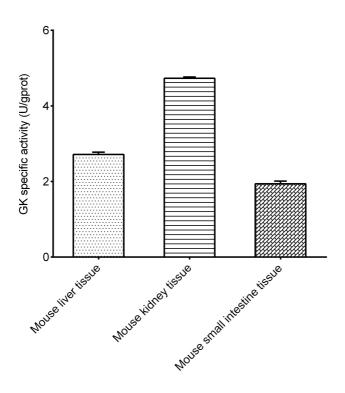
例如检测小鼠肝组织(数据仅供参考):

取 $10 \mu L$ 10 %小鼠肝组织上清液加入到酶标板孔内,按操作表操作,结果如下:标准曲线: y=0.1932 x+0.0052,测定孔 A_1 平均值为0.060,测定孔 A_2 平均值为0.240,10 %小鼠肝组织匀浆蛋白浓度为13.20 gprot/L,计算结果为:

GK活力(U/gprot) =
$$(0.240 - 0.060 - 0.0052) \div 0.1932 \div 13.20 \div 25 \times 1000$$

= 2.74 U/gprot

接说明书操作,测定小鼠肝组织(10%组织匀浆蛋白浓度13.20 gprot/L, 加样量 $10\,\mu$ L)、小鼠肾组织(10%组织匀浆蛋白浓度10.55 gprot/L, 加样量 $10\,\mu$ L)、小鼠小肠组织(10%组织匀浆蛋白浓度7.75 gprot/L, 加样量 $10\,\mu$ L)中的GK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	酶活不够	增加检测样本体积或增加样本 匀浆浓度

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。