（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 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	工作液 (Working Solution)	6 mL ×1 瓶	12 mL ×1 瓶	-20ºC 避光保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	终止液 (Stop Solution)	6 mL ×1 瓶	12 mL ×1 瓶	-20ºC 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	标准品 (Standard)	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	-20ºC 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 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℃，试剂一可分装-20℃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℃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，4ºC，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 A_1。

④ 37 ℃ 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 A_2。

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 ℃ 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 A_2。		

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℃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。

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

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 A_2 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

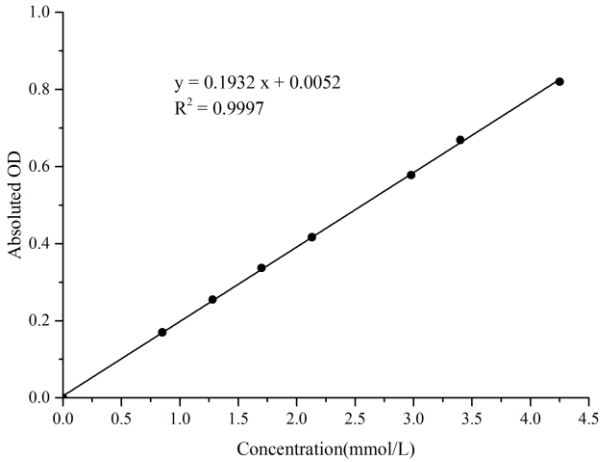
检测范围	9.28-170.00 U/L	批间差	6.5-8.0%
灵敏度	9.28 U/L	批内差	3.0-3.6%
稀释回收率	96-100%		

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 值	0.046	0.215	0.300	0.383	0.463	0.621	0.712	0.865
	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

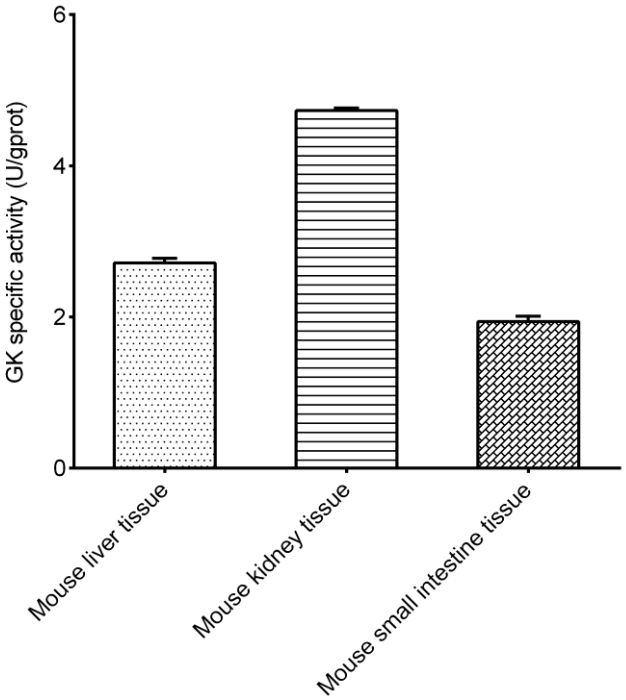
例如检测小鼠肝组织(数据仅供参考)：

取10 μL 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：

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

$$= 2.74\ U/gprot$$

按说明书操作，测定小鼠肝组织(10%组织匀浆蛋白浓度13.20 gprot/L，加样量10 μL)、小鼠肾组织(10%组织匀浆蛋白浓度10.55 gprot/L，加样量10 μL)、小鼠小肠组织(10%组织匀浆蛋白浓度7.75 gprot/L，加样量10 μL)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。