

(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-K793-M

产品规格: 96T(40 samples)

检测仪器: 酶标仪(390-410 nm)

Elabscience®单酰基甘油酯酶(MAGL)比色法测试盒
Monoacylglycerol Lipase (MAGL) 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血清(浆)、动物组织及细胞中单酰基甘油酯酶(MAGL)的酶活。

检测原理

单酰基甘油酯酶(Monoacylglycerol Lipase, MAGL)是一种丝氨酸水解酶,分布广泛。MAGL 不仅可分解三酰甘油,在脂质代谢中发挥重要作用,还可水解 2-花生四烯酸,调节体内大麻素系统信号传导。本试剂盒的作用原理是底物被 MAGL 催化,生成的产物可与显色剂反应,通过检测单位时间内显色物质生成量,可计算样品中的 MAGL 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)	25 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	1.2 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	抑制剂 (Inhibitor)	0.5 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	裂解液 (Lysis Solution)	5 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	1 mmol/L 标准品 (1 mmol/L Standard)	2 mL×1 瓶	-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(检测波长范围 390-410 nm，最佳检测波长为 400 nm)

试剂：生理盐水(0.9% NaCl)

试剂准备

① 检测前，所有试剂需要平衡至25℃，注意避光，否则会影响检测结果。

② 工作液的配制：

按试剂二：试剂一体积比=1：19 混匀。例如，取 200 μL 试剂二，加入 3800 μL 试剂一，混匀，即得到工作液，按此方法配制的工作液可供约 20 个孔添加。按需配制，需避光保存，30 min 内使用完毕。

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	0.2	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	1
1 mmol/L 标准品(μL)	0	40	80	100	120	140	160	200
双蒸水(μL)	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小鼠肝组织，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 1×10^6 个细胞加入 200 μ L 试剂四，每隔 5 min 混匀 1 次，共混匀 3 次，10000 ×g 离心 10 min，留取部分上清液进行蛋白浓度测定。

血清(浆)样本：直接检测。

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：1.05-39.70U/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	50-500	1×10^6 个 K562 细胞	不稀释
10%小鼠心组织	3-10	1×10^6 个 Molt 细胞	不稀释
10%小鼠肝组织	50-500	小鼠血浆	3-50
10%小鼠肺组织	20-200	胎牛血清	5-50

注：稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

实验关键点

标准品和工作液的使用和配制过程中注意避光，工作液配制好后请 30 min 内使用。

操作步骤

- ① 标准孔：取 20 μL 不同浓度标准品溶液，分别加入相应酶标孔中；
测定孔：取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中；
对照孔：取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①中对照孔中加入 10 μL 试剂三；
向步骤①中测定孔中加入 10 μL 生理盐水。
- ③ 37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育 10 min。
- ④ 向标准孔中加入 190 μL 的试剂一；
向测定孔、对照孔中加入 180 μL 工作液。
- ⑤ 37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育 5 min，使用酶标仪于 400 nm 检测各孔的 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔	对照孔
不同浓度标准品(μL)	20	--	--
待测样本(μL)	--	20	20
试剂三(μL)	--	--	10
生理盐水(μL)		10	--
37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育 10 min			
试剂一(μL)	190	--	--
工作液(μL)	--	180	180
37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育 5 min，使用酶标仪于 400 nm 检测各孔的 OD 值。			

本试剂盒检测组织与细胞样本时，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： $y = ax + b$

血清(浆)中单酰基甘油酯酶(MAGL)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的对硝基苯酚所需要的酶量为一个酶活单位。

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

细胞、组织样本中单酰基甘油酯酶(MAGL)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的对硝基苯酚所需要的酶量为一个酶活单位。

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

注解：

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标准曲线的斜率

b: 标准曲线的截距

ΔA : 样本测定孔绝对 OD 值, $\Delta A = A_{测} - A_{对}$

t: 反应时间, 5 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: 1 mmol/L=1000 μmol/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

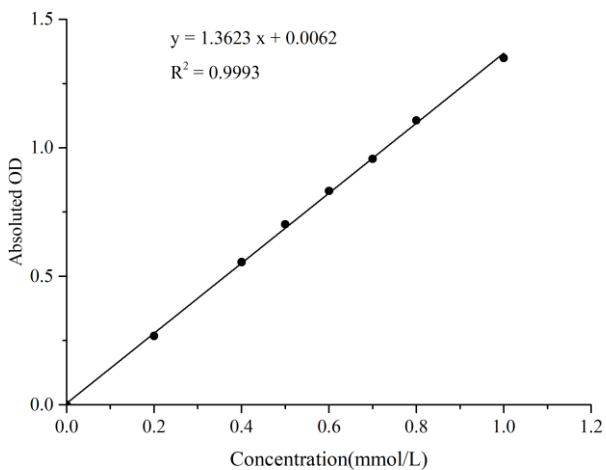
检测范围	1.05-39.7 U/L	批间差	3.3-10.2%
灵敏度	1.05 U/L	批内差	1.8-5.0%
稀释回收率	95-100%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20 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	0.2	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	1
OD 值	0.041	0.305	0.597	0.742	0.869	0.995	1.148	1.36
	0.041	0.311	0.593	0.744	0.877	1.001	1.148	1.42
平均 OD 值	0.041	0.308	0.596	0.743	0.873	0.998	1.148	1.39
绝对 OD 值	0	0.267	0.555	0.702	0.832	0.957	1.107	1.348

② 绘制标准曲线(如下图):



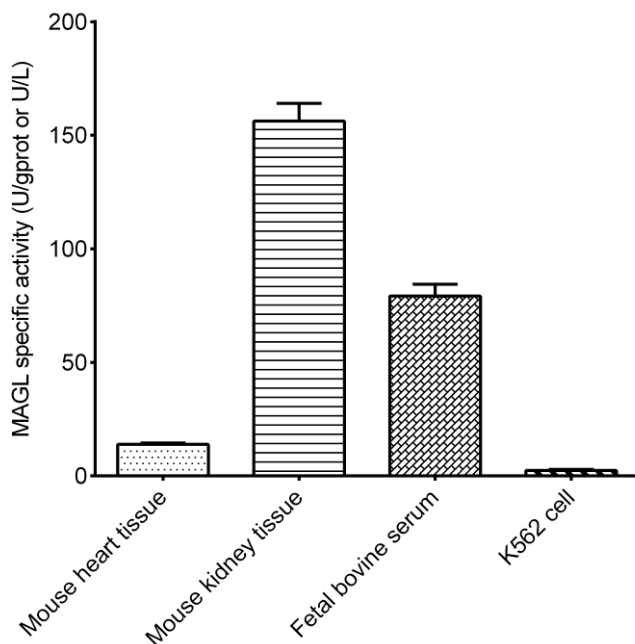
附录2 实例分析

例如检测小鼠心组织(数据仅供参考):

取稀释5倍的10%小鼠心组织匀浆上清液20 μL , 按操作表操作, 结果如下:
标准曲线: $y = 1.3623x + 0.0062$, 测定孔平均OD值 $A_{\text{测}} = 0.714$, 对照孔平均OD值 $A_{\text{对}} = 0.479$, $\Delta A = 0.714 - 0.479 = 0.235$, 10%小鼠心组织匀浆蛋白浓度为10.14 gprot/L, 计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{MAGL活力(U/gprot)} &= (0.714 - 0.479 - 0.0062) \div 1.3623 \div 5 \times 5 \div 10.14 \times 1000 \\ &= 16.56 \text{ U/gprot} \end{aligned}$$

按说明书操作, 测定小鼠心组织(10%组织匀浆蛋白浓度10.14 gprot/L, 稀释5倍, 加样量20 μL)、小鼠肝组织(10%组织匀浆蛋白浓度12.53 gprot/L, 稀释200倍, 加样量20 μL)、胎牛血清(稀释20倍, 加样量20 μL)、K562细胞(1×10^6 个细胞匀浆蛋白浓度5.05 gprot/L, 加样量20 μL)、MAGL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	工作液放置时间过长或已分解	工作液现配现用，严格避光。
测定孔吸光值过高	样本酶活过高	稀释样本
测定孔吸光值与对照组无明显差异	样本酶活过低	可适当延长反应孵育时间

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。

