精氨酸酶活性检测试剂盒说明书

微量法

规格：100T/48S

产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液二	液体 0.6 mL×1 支	-20℃保存
试剂一	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 4mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 10mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 13mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	液体 5.5mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1mL×1 支	2-8℃保存
96 孔板	96 孔×1 块	-
封板膜	2 张	-

溶液的配制：

1、提取液二和试剂五为易挥发试剂，用完及时拧盖封口。

2、提取液的配制：按提取液一：提取液二=990μL：10μL（1T）的比例配制，根据样本量现配现用，禁止将提取液二一次性全部加入提取液一中。

3、试剂一：临用前加入 3.2mL 试剂二，充分溶解，请勿放置于-20℃保存。2-8℃可保存 4 周。

4、标准品：1mol/L（即 1000μmol/mL）尿素标准液。

产品说明：

精氨酸酶（Arginase）又称 L-精氨酸尿素水解酶或 L-精氨酸脒基水解酶，是一种锰金属酶。精氨酸酶存在于细菌、酵母、植物、无脊椎动物和脊椎动物中，并被认为最早出现在细菌中。微生物体内的精氨酸酶其主要功能可能是参与维持 L-精氨酸的动态平衡，并参与调控多种重要代谢过程。

精氨酸酶将 L-精氨酸（L-arginine）分解为 L-鸟氨酸（L-ornithine）和尿素（urea），尿素与α-异亚硝基苯丙酮反应生成 560nm 处存在吸收峰的衍生物，通过测定尿素的生成量，可计算得到精氨酸酶活性大小。

$$\text{L-arginine} \xrightarrow{\text{Arginas}} \text{L-ornithine+ Urea}$$

$$\text{Urea+ 2-Propanedione-2-Oxime} \longrightarrow \text{Derivatives（560nm）}$$

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、分析天平、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、蒸馏水和冰。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、组织：按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。12000g 4℃离心 20min，取上清，置冰上待测。

2、细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000g 4℃离心 20min，取上清，置冰上待测。。

二、测定步骤

1、可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 560nm，可见分光光度计用蒸馏水调零。

2、标准溶液的制备：将标准品用蒸馏水分别稀释为 50、25、12.5、6.25、3.125 μmol/mL 的标准溶液。

3、标准品稀释表

序号	稀释前浓度（μmol/mL）	标准液体积（μL）	蒸馏水体积（μL）	稀释后浓度（μmol/mL）
1	1000	100	1900	50
2	50	500	500	25
3	25	500	500	12.5
4	12.5	500	500	6.25
5	6.25	500	500	3.125

备注：下述实验中每个标准管需48μL标准溶液（注意不要在此步骤直接检测吸光度）。

4、在1.5mLEP管中按下表步骤加样：

试剂名称（μL）	测定管	对照管	标准管	标准空白管
样本	48	48	-	-
标准品	-	-	48	-
蒸馏水	-	-	-	48
试剂一	24	24	24	24
试剂三	72	72	72	72
试剂四	-	96	96	96
37℃避光反应 30min				
试剂四	96	-	-	-
8000g 常温离心 5min，另取一支 1.5mLEP，吸取 200μL 上清液于 EP 管中				

上清液	200	200	200	200
试剂五	40	40	40	40
沸水浴避光反应 40min（缠封口膜，防止爆盖），冰水冷却，8000g 常温离心 5min，吸取上清 200μL 上清液于微量玻璃比色皿/96 孔板中，测定在 560nm 处的吸光度，记作 $A_{测定}$，$A_{对照}$，$A_{标准}$，$A_{标准空白}$。$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}$，$\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{标准空白}$。（标准管和标准空白管只需做 1-2 次，每个测定管需设置一个对照管。）				

三、精氨酸酶活性计算

1、标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度（x，μmol/mL）和吸光度$\Delta A_{标准}$（y，$\Delta A_{标准}$），建立标准曲线。根据标准曲线，将$\Delta A_{测定}$代入方程得到x（μmol/mL）。

2、精氨酸酶活计算

(1)按样本蛋白浓度计算

单位的定义：37℃每mg组织蛋白每分钟催化产生1μmol尿素定义为一个酶活力单位。

精氨酸酶活性（U/mg prot）$=x\times V_{样}\div(Cpr\times V_{样})\div T\times F= x\div 30\div Cpr\times F$

(2)按样本质量计算

单位的定义：37℃每g组织每分钟催化产生1μmol尿素定义为一个酶活力单位。

精氨酸酶活性（U/g 质量）$= x\times V_{样}\div(W\div V_{样总}\times V_{样})\div T\times F= x\div 30\div W\times F$

(3)按细菌或细胞数目计算

单位的定义：37℃每10^6个细菌或细胞每分钟催化产生1μmol尿素定义为一个酶活力单位。

精氨酸酶活性（U/10^6 cell）$= x\times V_{样}\div(N\div V_{样总}\times V_{样})\div T\times F= x\div 30\div N\times F$

$V_{样}$：反应体系中加入的样本体积，0.048mL；$V_{样总}$：加入的提取液体积，1mL；T：反应时间，30min；Cpr：蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细胞或细菌数目，以10^6计； F：样本稀释倍数。

注意事项：

如果测定吸光值大于 1.5 或$\Delta A_{测定}$大于 0.7，可以对样本进行稀释或者缩短第一步 37℃反应时间；测定吸光值或$\Delta A_{测定}$过小，可以加大样本量或者延长第一步 37℃反应时间。最终计算时同步修改计算公式。

实验实例：

1、称取 0.1198g 小鼠肾脏组织，加入提取液进行冰浴匀浆，按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}=0.425-0.102=0.323$，带入标准曲线 y=0.0168x-0.0541（R^2 = 0.9941），x=22.446 μmol/mL，带入公式计算：

精氨酸酶活性（U/g 质量）$= x\div 30\div W\times F$ =6.245 U/g 质量

2、称取 0.0989g 胡萝卜，加入提取液进行冰浴匀浆，按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算$\Delta A_{测定}=A_{测定}-A_{对照}=0.086-0.063=0.023$，带入标准曲线 y=0.0168x-0.0541（R^2 = 0.9941），x=4.5893 μmol/mL，带入公式计算：

精氨酸酶活性（U/g 质量）$= x\div 30\div W\times F$=1.547 U/g 质量