

天
净
沙
系
列

CAT#:7-01125
常温运输和保存

BINGENE

精氨酸酶活性测定试剂盒
(430nm 分光光度法)

使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: www.bingene.com; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	精氨酸酶是一种含锰酶，催化精氨酸转化为尿素和鸟氨酸。精氨酸酶有两种亚型存在于大多数哺乳动物中，它们的组织分布和亚细胞定位不同。精氨酸酶 I 是一种主要在肝脏中表达的细胞质蛋白，它催化尿素循环的第五步和最后一步。精氨酸酶 II 是一种具有更广泛组织分布的线粒体蛋白，其功能包括一氧化氮和多胺代谢。精氨酸酶 I 活性或表达降低导致常染色体隐性遗传病高精氨酸血症。血清精氨酸酶活性增加与肝损伤和某些病理状况如癌症有关。精氨酸酶也参与免疫系统的多种炎症反应。 精氨酸酶活性测定试剂盒提供了一种简单而直接的方法来测量各种样品中的精氨酸蛋白酶活性，如酶制剂、血清、血浆和组织培养物。在该测定中，精氨酸酶催化精氨酸转化为尿素和鸟氨酸。生成的尿素与显色试剂发生特异性反应，产生与精氨酸酶活性成比例的显色产物，在 430nm 处测定吸光值并进行计算就可以得出精氨酸酶活性。该试剂盒对于 2 小时 96 孔板精氨酸酶活性检测具有 0.3 单位/L 的检测限。本试剂盒足够 200 次比色测定。			
规格及成分	本产品使用塑料袋包装			
	成份	编号	规格	包装材料
	精氨酸缓冲液，pH 9.5	7-01125a	4mL	5ml 本色管
	试剂一	7-01125b	25mL	30 本色瓶
	尿素标准品 50mg/dL	7-01125c	1ml	1.5ml 本色管
	Mn 溶液	7-01125d	1mL	1.5ml 本色管
	试剂二	7-01125e	25mL	30ml 本色瓶
	使用手册	7-01125sc	1 份	无
运输及保存	-20℃运输和保存，有效期一年。			
自备试剂	96 孔平底板 (建议使用透明板进行比色分析)、分光光度计多孔板读数器、10 kDa 分子量截止过滤器、细胞裂解试剂 (蛋白酶抑制剂 Pepstatin A)、亮抑蛋白酶肽 (Leupeptin)、Triton™ X-100			
使用方法	样本的前处理： 1、开盖前请短暂离心小瓶。测定前将所有试剂平衡至室温。使用超纯水制备样品和试剂。 注意：2 小时内使用完所有重组试剂 2、使用前请将精氨酸缓冲液预热至 37℃。 3、用 176 µl 水稀释 24µl 尿素标准溶液 (50mg/dL) 制备 1mM 尿素标准工作溶液。剩余未用完的 50 mg/dL 尿素标准溶液储存在 - 20℃。			

注意：仅供研发使用。不用于药物、家用或其他用途。

储存/稳定性：该试剂盒在室温下装运。将精氨酸缓冲液和尿素标准溶液储存在 -20℃条件下， 所有其他试剂存储在 2 - 8℃在下。 为保持试剂完整性，避免重复冻融。

操作步骤

一、样品制备

1、 血清和血浆样品制备（此类样品含有尿素），使用 10kDa 分子量截止过滤器可以清除尿素。

2、 在截止过滤器中加入高达 100 μL 的血清/血浆样品，并用水稀释至 500 uL。将样品以 14000 g 转速离心 30 分钟。检查样品水平，理想情况下样品水平应小于 50 uL。加水至 500ul 并重复离心。

2、 收集浓缩样品并用移液管测量最终体积。调整最终体积，以便有足够的样品用于反应和样品空白。

二、细胞裂解液的制备

1、 收集约 1×10^6 个细胞，并用 PBS 洗涤。在 4℃下 1000g 离心 10 分钟。在 100μl 含 1μM 胃蛋白酶抑制剂 A，1μM 亮肽素和 0.4% (w/v) Triton X-100 的 10mM Tris-HCl (pH7.4) 中裂解细胞 10 分钟。将样品以 13000g 离心 10 分钟以除去不溶物质。

2、 向 96 孔板的两个孔（样品孔和样品空白对照孔各一个）中的每个孔中加入最多 40μl 样品上清液。用水将每个孔的最终体积定容至 40μl。

注意：对于未知样品，建议测试几种样品稀释液，以确保读数在测定的线性范围内。尽管对于精氨酸酶 2 小时反应，该测定法的线性范围为 0.3 - 20 单位/L，但如果稀释样品，则该测定法效果最佳，因此表观活性介于 1 - 10 单位/L 之间。

三、尿素标准液配制：

1、 加入 50μL 制备的 1mM 标准工作溶液和 50μL 水以间隔 96 孔板的孔。

四、测定反应

1. 根据表 1 中的方案制备 5 ×底物缓冲液。每个样品和样品空白孔需要 10μl 的 5×底物缓冲液。

表 1 5 ×底物缓冲液

试剂	体积
精氨酸缓冲液	8μl
Mn 溶液	2μl

2、 向每个样品孔中加入 10μl 5×底物缓冲液（样品空白孔不添加）。使用水平振

荡器或移液器充分混匀。在 37℃ 孵育平板 2 小时。在孵育期间盖上平板盖。

3、根据表 2 中的方案制备尿素试剂。每孔需要 200μL 尿素试剂（尿素标准品，水，样品和样品空白孔）。

表 2 尿素溶液

溶剂	体积
试剂一	100μl
试剂二	100μl

注意：试剂二可能呈现黄色

4、为了终止精氨酸酶反应，向每个孔（尿素标准品，水，样品和样品空白孔）中加入 200μl 制备的尿素试剂。然后向样品空白孔中加入 10ul 5X 底物缓冲液。敲击盘子混合。在室温下孵育 60 分钟。

注意：对于某些样品，添加尿素试剂可能会导致试剂浑浊。如果发生这种情况，将样品转移到离心管中并以 13000g 离心 5 分钟。将上清液转移回平板并读取吸光度。

5、测量 430 nm 处的吸光度（A430）

五、计算

样品的精氨酸酶活性可以通过以下等式确定：

活性=
$$\frac{A(430)\text{样品}-A(430)\text{空白}}{A(430)\text{标准品}-A(430)\text{水}} \times \frac{1\text{mM} \times 50 \times 10^3}{V \times T}$$

T=以分钟为单位的反应时间

V=加入到每空的样品体积（1-40 μL）

1mm=尿素标准浓度

50=反应体积（μL）

10³=mM 至μM 的转换系数

注意：精氨酸酶反应的孵育时间可能在 0.5-4 小时之间变化，具体取决于精氨酸酶的活性。如果校正样本之间的比率：[(A430)样品-（A430）空白]和校正后的标准[(A430)标准-(A430)水]大于 2，要么在水中稀释样品并重复测定，要么使用较短的反应时间。精氨酸酶的一个单位是在 pH 9.5 和 37℃ 下每分钟将 1.0μmolL-精氨酸转化为鸟氨酸和尿素的酶量。

计算实例：

(A430) 样本=1.8

(A430) 空白=0.7

(A430) 标准=1.3

	(A430) 水=0.5 T=120 分钟 V=40 活性=$\frac{1.8-0.7}{1.3-0.5} \times \frac{1\text{mM} \times 50\mu\text{l} \times 10^3}{40\mu\text{l} \times 120\text{min}}$ 1.375×10.4 单位/L=14.3 单位/L
关联产品	淀粉酶活性测定试剂盒（660nm 分光光度法）