

精氨酸酶检测试剂盒 (50T)

说明

精氨酸酶是一种含锰酶，可催化精氨酸转化为尿素和鸟氨酸。大多数哺乳动物体内存在两种同种型精氨酸酶，其组织分布和亚细胞定位有所不同。精氨酸酶 I 是一种胞质蛋白，主要在肝脏中表达，在肝脏中催化尿素循环的第五步和最后一步。精氨酸酶 II 是一种线粒体蛋白，组织分布更广，其功能可包括一氧化氮和多胺代谢。精氨酸酶 I 的活性或表达降低可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态（如癌症）有关。精氨酸酶还参与免疫系统的多种炎症反应，例如巨噬细胞介导的细胞毒性。测试原理是根据精氨酸酶反应中产生的尿素与色素原形成一种有色复合物，其颜色深浅与样本中精氨酸酶的活性对应成比例，可检测低至 0.5U/L 的精氨酸酶活性。

应用

该试剂盒适用于检测酶制备体系、血清、血浆、组织培养物及类似样品中的精氨酸酶活性。

试剂盒组成和保存

精氨酸溶液： 1 mL	-20℃ 保存
锰溶液： 300 μ L	4℃ 保存
试剂 A： 6 mL	4℃ 保存
试剂 B： 6 mL	4℃ 保存
标准品： 1 mL 500 mg/L	-20℃ 保存

试剂制备

检测前，请将试剂放置至室温。

底物缓冲液配制：按 4:1 的比例将精氨酸溶液和锰溶液混合。每份测试需 10 μ L 底物缓冲液。

1 mM 尿素标准品配制：将 36 μ L 500 mg /L 尿素和 264 μ L 的纯水混合。

检测步骤

1、精氨酸酶反应：将 40 μ L 样本和 10 μ L 底物缓冲液共同放入 96 孔板中；取 40 μ L 样本(作为空白对照)、50 μ L 水和 50 μ L 1 mM 尿素标准品分别加入其他孔中，在 37℃ 下培养。培养时间决定于酶活性，如血清血浆样本需 2 小时。

注释：(1) 样本精氨酸酶活性为 0.5 - 40 U/L 最佳。若精氨酸酶活性太高，可用纯水稀释样本。(2) 血清和血浆样本中的尿素需在测试之前除去(见总则)。



2、测定：将等体积试剂 A 和试剂 B 混合，混合后的试剂应在 10 分钟内使用。将 200 μL 反应试剂加入到所有孔中 (注释：反应试剂会终止精氨酸酶反应)，然后加入 10 μL 底物缓冲液到样本空白对照孔中，轻敲孔板使其混合。

3、室温反应 15 分钟，在 430nm 或 520nm 波长下读取吸光度。

注意：某些样本中加入尿素试剂可能会引起浑浊，须将这种样本转移到微量离心管中以 14000 rpm 离心 5 分钟，取上清液测其吸光度。

酶活性计算

$$\begin{aligned}\text{精氨酸酶活性} &= \frac{\text{OD}_{\text{样品}} - \text{OD}_{\text{空白}}}{\text{OD}_{\text{标准}} - \text{OD}_{\text{空白}}} \times [\text{尿素标准}] \times 50 \times 10^3 / (40 \times t) \\ &= \frac{\text{OD}_{\text{样品}} - \text{OD}_{\text{空白}}}{\text{OD}_{\text{标准}} - \text{OD}_{\text{空白}}} \times 10.4 \quad (\text{U/L})\end{aligned}$$

OD 样本、OD 空白、OD 标准、OD 水分别是样本、空白样本、标准品和水的吸光度。[尿素标准] = 1 mM；t 是反应时间 (例如，60 min)；50 和 40 分别是反应和样本体积 (μL)。

单位换算：1U 精氨酸酶每分钟可以使 1 μmole L-精氨酸转化成鸟氨酸和尿素 (37°C, pH=9.5)。

备注

1. 精氨酸酶反应的培养时间根据精氨酸酶活性而定 (0.5-4 小时)。如果 $(\text{OD}_{\text{样本}} - \text{OD}_{\text{空白}}) / (\text{OD}_{\text{标准品}} - \text{OD}_{\text{水}})$ 的值大于 3.5，请用蒸馏水稀释待测样品，并再次检测，检测结果需要乘稀释系数。

2. 样本预处理：血清或血浆样本中含有尿素，尿素可通过薄膜滤器除去，推荐步骤：

(1) 在离心超滤管中加入 100 μL 的样本，用水稀释至 500 μL ，并在 14000 rpm 下离心 30 分钟。检查样本，理想样本体积应低于 50 μL 。加水稀释至 500 μL ，重复离心步骤。

(2) 倒出浓缩的样本稀释液并用吸量管测量最终体积。调节最终体积，保证有足够样本用于检测。

3. 细胞裂解物：收集约 10^6 个细胞的样本，用磷酸缓冲液冲洗，在 4°C、1000g 条件下离心 10 分钟，用 100 μL 包含 0.15 mM 抑肽素、0.2 mM 亮肽素和 0.4% (w/v) 曲通 X-100 的 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 溶液裂解细胞样本 10 分钟。所得样本在 20,000g、4°C 下离心 10 分钟，取上清进行检测。

预防措施：本产品仅供研究用，使用过程中应严格遵循实验安全措施，试剂 A 和试剂 B 含有硫酸，废液请分别收集。

