

β-葡萄糖醛酸苷酶(内源性)测试盒说明书(精简版)

(A053-1 β-Glucuronidase (β-GD) 测内源型 微板法 96T)

免责声明：测试前请仔细阅读说明书，预试后再进行批量实验，否则由此导致的后果用户自行承担！

一、测定原理：

β-葡萄糖醛酸苷酶作用于专一性底物释放出游离的酚酞，用比色法测定游离酚酞的量表示酶的活力。

二、试剂的组成和配制：(试剂盒有效期3个月)

试剂名称	试剂组成	保存
试剂一	粉剂×1支	-20℃以下保存
	稀释液 5mL×1瓶	4℃保存
	临用前每支粉剂加入一瓶稀释液配成试剂一应用液，充分混匀，现用现配。	
试剂二	显色剂 40mL×1瓶	4℃保存
试剂三	标准品粉剂×1支	4℃避光保存
	标准品溶剂 5mL×1瓶	4℃保存
	用时将一支标准品粉剂加 1mL 标准品溶剂溶解配成 10μmol/mL 酚酞标准液，充分混匀 4℃保存，再将 10μmol/mL 酚酞标准液用标准品溶剂 5 倍(1:4)稀释配成 2μmol/mL 酚酞标准液，现用现配。	
	附送 96 孔板一块	

三、所需仪器耗材及试剂：

含 540nm 波长的酶标仪及 96 孔板、37℃ 水浴锅或恒温箱、台式离心机、各种规格移液器、双蒸水、生理盐水 (0.9%) 或 PBS (0.1M)、涡旋混匀器、试管或离心管、蛋白测定试剂 (组织及细胞样本用，本公司有售)。

四、操作过程：

1、前处理：准确称取组织重量，按重量 (g) : 体积 (mL) = 1:9 的比例，加入 9 倍体积的生理盐水，低温 (0-4℃) 条件下匀浆，4000 转/分，离心 10 分钟，取上清液待测。

2、操作表：(可在 0.5ml 或 1.5ml 离心管中进行)

	空白管	标准管	测定管
双蒸水 (μL)	10		
2μmol/mL 酚酞标准液 (μL)		10	
匀浆上清 (μL)			10
R1 应用液 (μL)	50	50	50
混匀，37℃ 反应 1 小时			
R2 (μL)	400	400	400
混匀，8000 转/分，离心 10 分钟，每管取上清 200μL 加到 96 孔板中，540nm 处，酶标仪测定各孔吸光度值 A。			

五、单位定义和计算公式：

1、定义：每毫克组织蛋白在 37℃ 条件下，每分钟催化反应生成 1μmol 的酚酞的酶量为 1 个酶活力单位 (U)。

2、计算公式：

$$\beta - \text{GD 活力} \left(\frac{\text{U}}{\text{mgprot}} \right) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div T \div \text{Cpr}$$

C_{标准}: 标准液浓度, 2μmol/mL;

T: 反应时间, 60min;

Cpr: 样本蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白)。

六、注意事项：

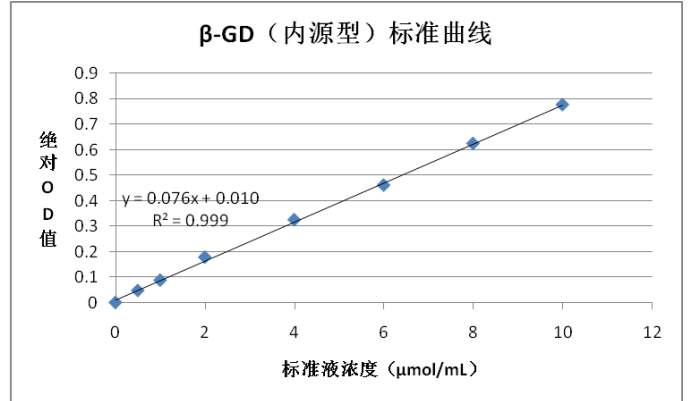
- 试剂配制严格按照操作进行，注意避光；
- 组织匀浆一定要预先做好预实验，确定最佳取样浓度 (参照附录二)；
- 标准曲线也可以不做，不影响实验。

附录一：β-GD 标曲制作

把一支标准品粉剂先用 1mL 标准品溶剂溶解，配成 10μmol/mL 的标准，再把该浓度标准稀释成 8 μmol/mL、6 μmol/mL、4 μmol/mL、2 μmol/mL、1μmol/mL、0.5 μmol/mL、0μmol/mL 的各浓度标准，按标准管操作进行实验得到如下数据：

标准液浓度 (μmol/mL)	0	0.5	1	2	4	6	8	10
OD 值	0.0462	0.0932	0.1337	0.2238	0.3708	0.5066	0.6699	0.8223
绝对 OD 值	0	0.047	0.0875	0.1776	0.3246	0.4604	0.6237	0.7761

标准曲线为：



标准曲线用户可以不画，按公式计算即可。

附录二：β-GD 样本曲线制作

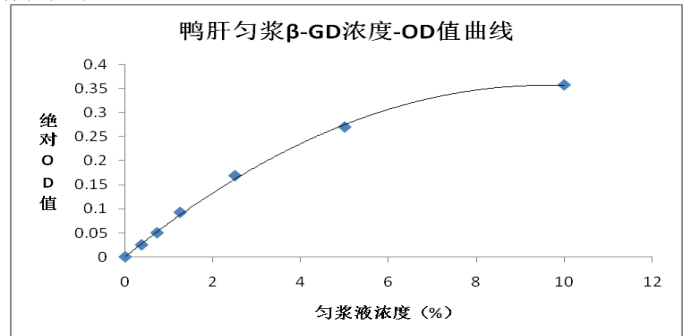
把新制备的 10% 鸭肝匀浆用生理盐水 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍、32 倍稀释后，进行如下实验：

	空白管	测定管
双蒸水 (mL)	10	
不同浓度匀浆 (mL)		10
试剂一应用液 (mL)	50	50
混匀，37℃ 反应 1 小时		
试剂二 (mL)	400	400
混匀，3500 转/分，离心 10 分钟，每管取上清 200μL 加到 96 孔板中，540nm 处，酶标仪测定各孔吸光度值 A。		

结果及数据：

匀浆浓度%	0	0.3725	0.725	1.25	2.5	5	10
OD 值	0.0462	0.0711	0.0963	0.1387	0.2150	0.3162	0.4037
绝对 OD 值	0	0.0249	0.0501	0.0925	0.1688	0.2700	0.3575

作图如下：



由上图可以看出：该样本匀浆浓度与 OD 值呈曲线关系，而样本最佳取样浓度为 OD 值 0-0.200 内的曲线对应的浓度 (此时为正比关系)，即最佳取样浓度可参考绝对 OD 值在 0.2 以内的样本浓度。