

精氨酸（Arg）含量检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号：D100840

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

| 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 9 mL×1 瓶 | 2-8℃ 保存 |
| 试剂一 | 粉剂×1 支 | 2-8℃ 保存 |
| 试剂二 | 液体 15 mL×1 瓶 | 2-8℃ 保存 |
| 试剂三 | 液体 15 mL×1 瓶 | 2-8℃ 保存 |
| 试剂四 | 液体 15 mL×1 瓶 | 2-8℃ 保存 |
| 标准品 | 粉剂×1 支 | 2-8℃ 保存 |

溶液的配制：

1. 试剂一：临用前加入 1.5mL 无水乙醇，充分溶解。-20℃可以保存 4 周。
2. 工作液配制：根据样本量按照试剂一：试剂二 = 50 μ L：450 μ L（500 μ L，2T）的比例配制，现配现用。
3. 标准品：临用前加入 0.918 mL 蒸馏水，充分溶解，配制成 62.5 μ mol/mL 精氨酸标准溶液。临用前取 10 μ L 的 62.5 μ mol/mL 精氨酸标准溶液于 EP 管中，加入 790 μ L 蒸馏水充分溶解，配制成 0.78125 μ mol/mL 的精氨酸标准溶液。

产品说明：

精氨酸(Arginine)是人体和动物体内的半必需氨基酸，在机体中参与蛋白质的合成代谢、以及多胺和 NO 的合成，起着重要的生理作用。精氨酸有降低血压的作用，在体内精氨酸能够分解成为一氧化氮，一氧化氮

能松弛血管壁平滑肌，调节血管弹性，对血管内膜有修复作用。精氨酸能够刺激并诱导肾上腺激素分泌，从而降低血糖，减少身体中脂肪酸的生产，能使高血糖患者的血糖降至正常水平。

精氨酸在碱性介质中与甲萘酚和次氯酸钠生成红色生成物，其在 525nm 处有特征吸收峰，以此计算精氨酸含量。



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。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、涡旋混匀仪、分析天平、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、蒸馏水、无水乙醇和冰。

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：按照质量（g）：提取液一（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g，加入 1mL 提取液一）加入提取液一，冰浴匀浆后于 4℃，12000g 离心 10min，取 0.8mL 上清液，再缓慢加入 0.15mL 提取液二，缓慢吹打混匀至无气泡产生，4℃ 12000g 离心 10min 后取上清待测。
2. 细胞：按照细胞数量（10⁶个）：提取液一（mL）为 5~1：1 的比例（建议 5 百万细胞加入 1mL 提取液一），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；于 4℃，12000g 离心 10min，取 0.8mL 上清液，再缓慢加入 0.15mL 提取液二，缓慢吹打混匀至无气泡产生，4℃ 12000g 离心 10min 后取上清待测。
3. 血清（浆）等液体：取 100μL 液体加入 1mL 提取液一，4℃ 12000g 离心 10min，取 0.8mL 上清液，再缓慢加入 0.15mL 提取液二，缓慢吹打混匀至无气泡产生，4℃ 12000g 离心 10min 后取上清待测。

注：试剂二需缓慢加入，加入后会产生大量气泡，建议使用 2mL EP 管进行操作。

二、测定步骤

1. 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 525nm，蒸馏水调零。
2. 在 1.5mLEP 管中按下表步骤加样：

| 试剂名称（μL） | 测定管 | 标准管 | 空白管 |
|----------|-----|-----|-----|
| 样本 | 250 | - | - |
| 标准品 | - | 250 | - |

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 蒸馏水 | - | - | 250 |
| 工作液 | 250 | 250 | 250 |
| 避光、冰浴 20min | | | |
| 试剂三 | 250 | 250 | 250 |
| 充分震荡 30s | | | |
| 试剂四 | 250 | 250 | 250 |
| 充分混匀后，冰浴反应 2min，于比色皿中测定在 525nm 处的吸光度，记作 A 测定，A 标准，A 空白。 ΔA 测定=A 测定-A 空白， ΔA 标准=A 标准-A 空白。（标准管和空白管只需做 1-2 次） | | | |

三、精氨酸（Arg）含量计算

1. 按样本蛋白浓度计算

$\text{Arg 含量} (\mu\text{mol}/\text{mg prot}) = C \text{ 标准} \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times V \text{ 样} \div (Cpr \times V \text{ 样}) \times F = 0.781 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div Cpr \times F$

2. 按样本质量计算

$\text{Arg 含量} (\mu\text{mol}/\text{g 质量}) = C \text{ 标准} \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times (V \text{ 上清} + V \text{ 提取液二}) \div (W \times V \text{ 上清} \div V \text{ 提取液一}) \times F = 0.928 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W \times F$

3. 按细菌或细胞数量计算

$\text{Arg 含量} (\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}) = C \text{ 标准} \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times (V \text{ 上清} + V \text{ 提取液二}) \div (N \div V \text{ 上清} \div V \text{ 提取液一}) \times F = 0.928 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div N \times F$

4. 按液体体积计算

$\text{Arg 含量} (\mu\text{mol}/\text{mL}) = C \text{ 标准} \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times (V \text{ 上清} + V \text{ 提取液二}) \div (V \text{ 液体} \times V \text{ 上清} \div (V \text{ 液体} + V \text{ 提取液一})) \times F = 10.205 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times F$

C 标准：精氨酸标准溶液浓度，0.78125 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ；V 样：反应体系中加入的样本体积，0.25mL；V 上清：提取时上清的体积，0.8mL；V 提取液二：加入提取液二的体积，0.15mL；V 提取液一：加入提取液一的体积，1mL；V 液体：液体样本体积，0.1mL；Cpr：蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细胞或细菌数量，以 10^6 计；F：样本稀释倍数。

注意事项:

如果 ΔA 测定大于 0.8, 可以用蒸馏水对样本进行稀释; 如果 ΔA 测定小于 0.01, 可以加大样本量。最终计算时同步修改计算公式。

提取液一中含有蛋白质沉淀剂, 因此上清液不能用于蛋白浓度测定。如需测定蛋白含量, 需另取组织。

实验实例:

称取 0.1162g 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 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 空白=0.582-0.227=0.355, ΔA 标准=A 标准-A 空白=0.727-0.227=0.5, 带入公式计算:

$$\text{Arg 含量} (\mu\text{mol/g 质量}) = 0.928 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W = 5.670 \mu\text{mol/g 质量}。$$

称取 0.1186g 花生组织, 加入提取液进行冰浴匀浆, 按照测定步骤操作, 用 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 空白=0.661-0.227=0.434, ΔA 标准=A 标准-A 空白=0.727-0.227=0.5, 带入公式计算:

$$\text{Arg 含量} (\mu\text{mol/g 质量}) = 0.928 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W = 6.792 \mu\text{mol/g 质量}。$$

取人血清按前处理和实验步骤进行实验, 用 1mL 玻璃比色皿测得计算 ΔA 测定=A 测定-A 空白=0.314-0.227=0.087, ΔA 标准=A 标准-A 空白=0.727-0.227=0.5, 带入公式计算:

$$\text{Arg 含量} (\mu\text{mol/mL}) = 10.205 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \times F = 1.776 \mu\text{mol/mL}。$$

参考文献:

[1] Francis P S, Barnett N W, Foitzik R C, et al. Chemiluminescence from the Sakaguchi reaction [J]. Analytical Biochemistry, 2004, 329(2):340-341.