天净沙系列

CAT#:7-EC3.4.19.12

低温运输、-20℃保存

天净沙

# 木瓜样蛋白酶活性测定试剂盒（荧光光度法）

# Papain-Like Protease Activity Assay Kit

## 使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

## 产品及特点

本产品是荧光法测定木瓜样蛋白酶（Papain-like protease，PLpro，EC 3.4.19.12）活性的试剂盒。该酶选择性地识别并切割病毒多蛋白链的 LXGG 位点并参与复制酶的生成，它也催化蛋白脱泛素过程，在 SARS-CoV-1 和-2 等冠状病毒成熟和致病机制中起着重要作用，因此快速检测其酶活具有重要的意义。为此本公司开发了基于荧光光度法的 PLpro 活性检测试剂盒。试剂盒采用含 LXGG 序列的荧光标记多肽为底物，它被酶切后可在 360 nm 激发产生 460 nm 荧光，通过测定荧光值即可测定 PLpro 活性。本产品具有如下特点：

1. 即开即用，用户不需要单独购买并优化每个成分。
2. 使用便捷，整个实验可以在 2 小时内完成。
3. 96 孔板模式，尤其适合高通量检测。不适合比色皿检测。
4. 可用于含重组或天然 PLPro 酶的样本。
5. 提供重组的 SARS-CoV-2 PLpro 和荧光标准品。
6. 本产品足够 100 次 96 孔板测定实验，每次 40 μL 反应体系。
7. 一个木瓜样蛋白酶活性单位的定义为 37℃温度下每分钟释放 1 pmol荧光物质的酶量。
8. 本产品只可用于科研。

## 规格及成分

本产品采用小扁盒包装

| 成份 | 编号 | 规格 | 包装 |
|---|---|---|---|
| PLpro 荧光底物液 | C167698-69-3 | 2 mL | 2 mL 棕色管 |
| 2×PLpro 反应液 | 7-EC3.4.19.12a | 25 mL | 30 mL 本色瓶 |
| 5 ng/μL 重组 SARS-CoV-2 PLpro 酶液 | 5-P0DTC1-nsp3 | 50 μL | 0.5 mL 红盖管 |
| 5 μM 荧光标准品溶液 | 7-EC3.4.19.12b | 100 μL | 0.5 mL 棕色管 |
| DTT | CAS 3483-12-3 | 77 mg | 1.5 mL 本色管 |
| 使用手册 | 7- EC3.4.19.12sc | 1 份 | 无 |

## 运输及保存

低温运输、-20℃保存，PLpro 荧光底物液和重组 SARS-CoV-2 PLpro 酶液需-80℃保存，有效期半年。

## 自备试剂

待测样品，超纯水，DMSO，96 孔板（跟所用的荧光光度计兼容），可测 340 nm 激发光/460 nm 发射光的荧光光度计。

## 使用方法

**一、准备工作**

1. 首次使用本试剂盒时，在 DTT 管中加入 1 mL 自备超纯水，颠倒 20 次混匀后加 20 μL 到 PLpro 荧光底物液中，加 500 μL 到 2×PLpro 反应液中，

轻柔颠倒 20 次混匀后待用。没用完时上述溶液均存-20℃。

**二、配制至少 6 个稀释度的荧光标准品**

2. 配制 1 mL 1×PLpro 反应液：在 1 个 1.5 mL 离心管中加入 0.5 mL 2×PLpro 反应液和 0.5 mL 自备超纯水，涡旋 1 分钟混匀，常温放置待用。
3. 标记 7 个 1.5 mL 离心管，分别为 0、1、2、3、4、5、6。
4. 在每管中加入 50 μL 1×PLpro 反应液。盖上 0 号管作为对照。
5. 在 6 号管中加入 50 μL 5 μM 的荧光标准品溶液（试剂盒提供），涡旋 1 分钟混匀，得 2.5 μM 的荧光标准品稀释液。常温放置待用。
6. 换枪头，在 5 号管中加入 50 μL 2.5 μM 荧光标准品稀释液（上步稀释所得），涡旋 1 分钟混匀，得 1.25 μM 荧光标准品稀释液。常温放置待用。
7. 换枪头，在 4 号管中加入 50 μL 1.25 μM 荧光标准品稀释液（上步稀释所得），涡旋 1 分钟混匀，得 0.625 μM 荧光标准品稀释液。常温放置待用。
8. 重复上面的操作，直到在 1-6 号管中得到 2.5、1.25、0.625、0.313、0.156、0.078 μM 共 6 个荧光标准品稀释液，加上 0 号管共 7 个样本。常温放置待用。此溶液每次需新鲜配制。

**三、待测 PLpro 样本的制备**

9. 细胞培养上清液样本：收集培养细胞的上清，4℃ 1000×g 离心 10 分钟，收集上清，取少量按 1：1 的比例跟 2×PLpro 反应液混合，放冰上待用。未用完的存-80℃。
10. 细胞裂解液样本：4℃ 500×g 离心 10 分钟收集细胞，加入适量自备的细胞裂解液（建议使用 CHAP 细胞裂解液）到细胞沉淀中，重悬细胞，冰上放置 10 分钟裂解细胞，用枪头吹打 5 次，将裂解液全部转移到 1.5 mL 离心管中，4℃ 10000×g 离心 5 分钟，取少量按 1：1 的比例跟 2×PLpro 反应液混合，测定蛋白浓度，待用。未用完的存-80℃。

**四、PLpro 酶切反应设置**

11. 如有 N 个待测样本，每个做 1 次重复，则反应数为 N+8，其中 N 个用于待测样本，1 个用于空白对照，1 个用于 PLpro 阳性对照，6 个用于标曲样本。如每个样本做重复，则反应数应相应地变动。以下按 1 个样做 1 次重复示例。
12. 在 96 孔板的各反应孔中按下表顺序加入各成分，反应总体积为 40 μL。

| 成分 | 空白<br>对照孔 | 阳性<br>对照孔 | N+2 个<br>待测样品孔 | 标曲样品孔<br>(0-6 管) |
|---|---|---|---|---|
| 1×PLpro 反应液 | 20 μL | 不加 | 不加 | 不加 |
| 5 ng/μL PLpro 酶液 | 不加 | 20 μL | 不加 | 不加 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| N+2 个待测样本 | 不加 | 不加 | 各 20 μL | 不加 |
| 7 个标准品稀释液 | 不加 | 不加 | 不加 | 各 40 μL (0 号样到 0 号管，1 号样到 1 号管…) |
| PLpro 荧光底物 | 20 μL | 20 μL | 20 μL | 不加 |

13. 摇晃 30 秒混合均匀，放 37℃保温，每 5 分钟在 340 nm 激发光/460 nm 发射光条件下记录一次荧光值，共 30 分钟。

**五、数据分析**

14. 从所有数据中减去空白对照值，然后进行下面的计算。
15. 制作标准曲线求转换系数：6-0 号标准品的浓度分别为 2.5、1.25、0.625、0.313、0.156、0.078、0 μM，反应体积为 40 μL，故换算成绝对量分别为 100、50、25、12.5、6.25、3.13、0 pmol，以其为横轴，以测出的荧光值为纵轴，得到标曲方程式。R2 应大于 0.95（如果不是线性，需要跟厂家联系），其斜率即为转换系数。
16. 计算每个样本的斜率：以时间为横轴，以每个样本的荧光值为纵轴，得每个样本的线性区域（一般在前 5-15 分钟），然后计算出线性区斜率（速度）。
17. 计算每个样本酶活性单位数：本试剂盒一个木瓜样蛋白酶活性单位的定义为在 37℃温度下每分钟释放 1 pmol 荧光物质的酶量,故 40 μL 体系中 PLpro 酶活性单位数=线性区斜率÷转换系数。
18. 由于 40 μL 反应孔中加入的样本体积是 20 μL，上步得到的酶单位数相当于 20 μL 待测样本的酶单位数，根据第 9 步或第 10 步计算出的蛋白浓度，可计算出 20 μL 样本中蛋白的μg 数，则酶的比活=20 μL 样本中的酶单位数/20 μL 样本中的蛋白μg 数。
19. 本试剂盒提供的重组 SARS-CoV-2 PLpro 酶液酶活性为 71.85 U/mL，故比活为 14.37 U/μg，如果所测结果跟此数字不同，请跟厂家联系，找到原因后再继续。

| | |
|---|---|
| **关联产品** | 木瓜样蛋白酶 PLpro 抑制剂筛选试剂盒 |