天净沙系列

CAT#:7-EC3.4.22f

低温运输、-20℃保存

天净沙

半胱氨酸蛋白酶活性测定试剂盒（荧光法）

Cysteine Protease Activity Assay Kit

使用手册 V0.5

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半胱氨酸蛋白酶（Cysteine Protease，EC3.4.22）活性的试剂盒，其原理是在半胱氨酸蛋白酶作用下 N-琥珀酰-亮氨酸-缬氨酸-酪氨酸-7-氨基-4-甲基香豆素被分解，产生 7-氨基-4-甲基香豆素。7-氨基-4-甲基香豆素可在 380 nm 激发产生 460 nm 荧光，通过测定荧光值的增加量即可测定半胱氨酸蛋白酶活性。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. 最低检测限为 0.0018 U，线性范围在 0.0018 U-0.0136 U 之间。
4. 96 孔板模式，尤其适合高通量检测。不适合比色皿检测。
5. 可用于含重组或天然半胱氨酸蛋白酶的样本。
6. 提供半胱氨酸蛋白酶和荧光标准品。
7. 本产品足够 100 次 96 孔板测定实验，每次 40 μL 反应体系。
8. 一个半胱氨酸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。
9. 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
半胱氨酸蛋白酶荧光底物液	C94367-21-2	2 mL	2 mL 棕色管
2×半胱氨酸蛋白酶反应液	7-EC3.4.22r	25 mL	30 mL 本色瓶
5 ng/μL 半胱氨酸蛋白酶液	7-EC3.4.22a	50 μL	0.5 mL 红盖管
5 μM 荧光标准品溶液	7-EC3.4.22b	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-EC3.4.22sc	1 份	无

运输及保存

低温运输、-20℃保存，半胱氨酸蛋白酶荧光底物液和半胱氨酸蛋白酶液需-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 380 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 到半胱氨酸蛋白酶荧光底物液中，加 500 μL 到 2×半胱氨酸蛋白酶反应液中，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×半胱氨酸蛋白酶反应液：在 1 个 1.5 mL 离心管中加入 0.5 mL 2×半胱氨酸蛋白酶反应液和 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×半胱氨酸蛋白酶反应液。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. 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、待测半胱氨酸蛋白酶样本的制备

8. 用自备试剂制备待测样本：注意：样本中不得含有过氧化氢、金属离子（Hg^{2+}、Cu^{2+}、Zn^{2+}）和高浓度盐，会影响其活性。
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×半胱氨酸蛋白酶反应液混合，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×半胱氨酸蛋白酶反应液混合，测定蛋白浓度，待用。未用完的存-80℃。

四、半胱氨酸蛋白酶酶切反应设置

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 个用于半胱氨酸蛋白酶阳性对照，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	空白对照孔	阳性对照孔	N+2 个待测样品孔	标曲样品孔（0-6 管）
1×半胱氨酸蛋白酶反应液	20 μL	不加	不加	不加
5 ng/μL 半胱氨酸蛋白酶液	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…）
半胱氨酸蛋白酶荧光底物	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 380 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：本试剂盒一个半胱氨酸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 体系中半胱氨酸蛋白酶活性单位数=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. 本试剂盒提供的半胱氨酸蛋白酶液酶活性为 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	半胱氨酸蛋白酶抑制剂筛选试剂盒