天净沙系列

CAT#:7-EC3.4.24.3B

低温运输，-20℃保存

天净沙

微生物胶原酶活性测定试剂盒（600 nm 比色法）

Microbial Collagenase 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

本产品用于测定微生物胶原酶(Microbial Collagenase，EC3.4.24.3，CAS 9001-12-1）活性，其原理是微生物胶原酶催化底物胶原蛋白降解，从而产生氨基酸，氨基酸在酸性条件下，可以和茚三酮反应生成蓝紫色复合物，该物质在 600 nm 处有特征光吸收，故通过监测 OD 值随时间的增加量（ΔA600/min）即可计算酶活性。本产品具有如下特点：

1. 使用便捷，用户只需准备待测样本。
2. 提供 L-亮氨酸溶液作为阳性对照。
3. 最低检测限为 1.66 U，线性范围在 2.08 U-4.17 U 之间。
4. 本试剂盒 1 个微生物胶原酶活性单位的定义是在 37℃ pH 7.5 的条件下，每分钟能催化 1 μmol 氨基酸产生所需的酶量。
5. 本产品足够 100 次 1 mL 体系的比色皿检测或 400 次 250 μL 体系的 96 孔板检测。
6. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品采用塑料袋包装

成份	编号	规格	包装
微生物胶原酶 活性测定反应液	7-EC3.4.24.3Br	100 mL	125 mL 本色瓶
微生物胶原酶 活性测定底物干粉	7-EC3.4.24.3Bs	100 T	5 mL 本色瓶
微生物胶原酶 活性测定显色液	7-EC3.4.24.3Bc	100 mL	125 mL 本色瓶
5 mM L-亮氨酸溶液	C61-90-5A	5 mL	5 mL 本色瓶
使用手册	7-EC3.4.24.3Bsc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

自备试剂

待测样品，超纯水，比色皿，蛋白浓度测定试剂盒，紫外分光光度计。

使用方法

一、首次使用本试剂盒时配制下列溶液

1. 配制微生物胶原酶活性测定底物液：将所有微生物胶原酶活性测定底物干粉转移到微生物胶原酶活性测定反应液中，颠倒 1 分钟混匀充分溶解即得微生物胶原酶活性测定底物液。此溶液足够 100 次测定。可根据每次反应数分成小份，放-20℃或更低温度保存，每次取用 1 份。

二、制备待测样本

2. 用自备试剂制备待测样品。注意：由于本试剂盒测定的是氨基酸，故样本中也不得有氨基酸的成份。

3. 预留 10 mL 最后溶解样本的样本溶解液，作为后续测光吸收时的阴性对照。

4. 用自备试剂测定待测样本的蛋白浓度，以备后续计算比活时使用。

三、标准曲线梯度稀释液的制备

5. 标准曲线只需做一次，计算得到回归方程即可，下面以 6 个稀释度的标准曲线为例。

6. 标记 1-6 个 1.5 mL 离心管。

7. 分别向 1-5 号管中加入 500、450、400、350、300、250 μL 的 5 mM L-亮氨酸溶液，用超纯水补体积至 0.5 mL，得 5、4.5、4、3.5、3、2.5 mM 梯度的 L-亮氨酸溶液。

四、用光径 1 cm 的比色皿测定光吸收

8. 标记 N+7 个 1.5 mL 的塑料离心管，其中 N 个用于待测样品，1 个用于阴性对照，6 个用于标曲。

9. 按下表加入各成分：

成分	N 个样本管	阴性对照	阳性对照
样本酶液	40 μL	不加	不加
第 3 步所备的样本溶解液	不加	40 μL	不加
微生物胶原酶活性测定底物液	960 μL	960 μL	不加
混合均匀 37℃保温 30 min，95℃保温 5 min，13000×g 离心 10 min 取 200 μL 上清于新管后加入			
各梯度的 L-亮氨酸溶液	不加	不加	200 μL
微生物胶原酶活性测定显色液	1 mL	1 mL	1 mL
95℃保温 20 min			

10. 冷却到室温后迅速用分光光度计在 600 nm 测定 OD，测前用蒸馏水调零。

11. 得到的 OD 分别减去阴性对照的 OD 即得 N 个样本的 OD 和 6 个标准曲线样本的 OD。

五、数据处理

12. 以 L-亮氨酸浓度为横轴，以 OD600 为纵轴，以 1-6 号 L-亮氨酸标准曲线样本的数据用 excel 绘制标准曲线并得到计算公式。

13. 根据计算公式，用 N 个样本的 OD600 数据计算出其所对应的氨基酸浓度。根据微生物胶原酶活性的定义（每分钟能催化 1 μmol 氨基酸产生所需的酶量为 1 个单位）计算出酶的活性。

关联产品	丙氨酸脱氢酶活性测定试剂盒(340 nm 比色法)