天净沙系列

CAT#:EC3.6.5.2

低温运输和保存

小单体 GTP 酶活性测定试剂盒

Small Monomeric GTPase 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

本产品用于测定小单体 GTP 酶（Small Monomeric GTPase，EC3.6.5.2）活性。其原理是小单体 GTP 酶催化 GTP 形成 GDP 和游离的磷酸基团，磷酸基团可以与孔雀石绿以及钼酸盐形成绿色化合物。该绿色化合物在 630 nm 处有特征光吸收，故可以通过检测吸光度在 630 nm 处随时间的增加量间接检测小单体 GTP 酶活性。本产品具有如下特点：

1. 即开即用，使用便捷，用户不需要优化条件，只需准备待测样本。
2. 最低检测限为 0.18 U，线性范围在 0.25 U-0.71 U 之间。
3. 本试剂盒 1 个酶活性单位的定义是在 25℃ pH 7.0 的条件下，每分钟能催化 1 μmol 底物转化所需的酶量。由于一次催化反应产生一分子的磷酸基团,故 1 个酶活性单位相当于在 25℃ pH 7.0 的条件下每分钟催化 1 μmol 磷酸基团产生所需的酶量。
4. 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。
5. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品使用小扁盒包装

成份	编号	规格	包装
小单体 GTP 酶活性测定显色液成分 1 干粉	EC3.6.5.2c1	100 T	50 mL 棕色瓶
小单体 GTP 酶活性测定显色液成分 2 干粉	EC3.6.5.2c2	100 T	50 mL 棕色瓶
小单体 GTP 酶活性测定反应液	EC3.6.5.2r	120 mL	125 mL 本色瓶
小单体 GTP 酶活性测定底物干粉	EC3.6.5.2s	100 T	10 mL 本色瓶
1 mM 磷酸钾溶液	C7778-53-2A	1.5 mL	1.5 mL 本色管
使用手册	EC3.6.5.2sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，2-8℃保存，有效期一年。

自备物品

待测样品、蛋白浓度测定试剂盒、比色皿及与之匹配的分光光度计、96 孔板及与之匹配的分光光度计。

使用方法

一、首次使用本试剂盒时配制下列溶液

1. 配制小单体 GTP 酶活性测定显色液成分 1：将 50 mL 小单体 GTP 酶活性测定反应液加入到装有小单体 GTP 酶活性测定显色液成分 1 干粉的瓶中，颠倒摇晃 20 次溶解，得小单体 GTP 酶活性测定显色液成分 1。
2. 配制小单体 GTP 酶活性测定显色液成分 2：将 50 mL 小单体 GTP 酶活

性测定反应液加入到装有小单体 GTP 酶活性测定显色液成分 2 干粉的瓶中，颠倒摇晃 20 次溶解，得小单体 GTP 酶活性测定显色液成分 2。

3. 配制小单体 GTP 酶活性测定底物液：将 10 mL 小单体 GTP 酶活性测定反应液加入到装有小单体 GTP 酶活性测定底物干粉的瓶中，颠倒摇晃 20 次溶解，得小单体 GTP 酶活性测定底物液。
4. 如果一次实验没有用完上述溶液，需要放-20℃或更低温度保存。

二、待测样本的制备

5. 用自选方式制备待测样本，样本溶于缓冲液中，缓冲液 pH 值控制为 7.0。注意：由于 Cu^{2+}、Zn^{2+}等金属离子可能会改变小单体 GTP 酶构象，故样本中不得含有这些物质。同时，由于本试剂盒测定的是磷酸基团，故样本中也不得有磷酸基团的成分。
6. 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。
7. 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

8. 每次测量都应制作标准曲线，下面以 6 个稀释度的标准曲线为例。
9. 标记 1-6 个 1.5 mL 离心管，每个管中加入 0.7 mL 超纯水。
10. 将本试剂盒提供的 1 mM 磷酸钾溶液为 1 号管样品。
11. 2 号管中加入 0.7 mL 的 1 mM 磷酸钾溶液，充分震荡 1 分钟，得 0.5 mM 磷酸钾溶液。放冰上待用。
12. 换枪头，在 3 号管中加入 0.7 mL 0.5 mM 磷酸钾溶液（上步稀释所得），充分震荡 1 分钟，得 250 μM 磷酸钾溶液。放冰上待用。
13. 重复上面的操作直到得到 1 mM、0.5 mM、250 μM、125 μM、62.5 μM、31.25 μM 共 6 个稀释度的样品。放冰上待用。

四、用光径 1 cm 的比色皿测定光吸收

14. 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。
15. 按下表加入各成分：

成分	N 个样本管	阴性对照	6 个标曲管
自备样本溶解液	不加	100 μL	100 μL
N 个自备待测样本	各 100 μL	不加	不加
小单体 GTP 酶活性测定底物液	各 100 μL	100 μL	不加

各梯度的磷酸钾溶液	不加	不加	各 100 μL
混合均匀室温静置 30 min			
小单体 GTP 酶 活性测定显色液成分 1	各 400 μL	400 μL	各 400 μL
小单体 GTP 酶 活性测定显色液成分 2	各 400 μL	400 μL	各 400 μL
总体积	1 mL	1 mL	1 mL
混合均匀室温静置 30 min			

16. 迅速用分光光度计在 630 nm 测定 OD，测前用蒸馏水调零。

五、数据分析

17. 计算真实 OD630 光吸收：每个样本测得的光吸收减去阴性对照的光吸收即为每个样本的光吸收。共 N+6 个读数。
18. 制备标准曲线：以磷酸钾溶液的浓度为横轴，以其真实 OD630 光吸收为纵轴，绘制标准曲线。
19. 根据计算公式，用 N 个样本的 OD630 数据计算出其所对应的磷酸钾浓度。根据小单体 GTP 酶活性的定义（每分钟生成 1 μmol 磷酸基团所需要的酶量为 1 个单位）计算出酶的活性。
20. 计算样本的酶比活性：样本总体积乘以酶浓度 U/mL 即得样本总酶单位数 U，样本总体积乘以其蛋白浓度即得样本总蛋白量（以 mg 为单位），样本酶比活（U/mg）=总酶单位数/总蛋白量。

六、96 孔板检测

21. 操作同上，只是在设置反应时，各成份的用量降低 75%，只用 25%。同时光径不是 1 cm，要根据所用 96 孔板修改（需要咨询厂家）。

关联产品	蛋白质合成 GTP 酶活性测定试剂盒