天净沙系列

CAT#:EC3.4.16.4

低温运输和保存

天净沙

丝氨酸型 D-Ala-D-Ala 羧肽酶活性测定试剂盒

Serine-Type D-Ala-D-Ala Carboxypeptidase 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

本产品用于测定丝氨酸型 D-Ala-D-Ala 羧肽酶（Serine-Type D-Ala-D-Ala Carboxypeptidase，EC3.4.16.4）活性。其原理是 D-Ala-D-Ala 羧肽酶催化底物 D-丙氨酸-D-丙氨酸的肽键断裂反应生成 D-丙氨酸，之后 D-丙氨酸与改良型茚三酮反应生成了有色化合物，该有色化合物在 570 nm 处有特征光吸收，故通过监测吸光度在 570 nm 处随时间的增加，即可间接计算酶活性。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 37℃ pH 7.2 的条件下，每分钟能催化 1 μmol 底物转化所需的酶量。由于 1 个丝氨酸型 D-Ala-D-Ala 羧肽酶的转化将产生 2 个 D-丙氨酸分子，故 1 个酶活性单位相当于在 37℃ pH 7.2 的条件下每分钟催化产生 2 μmol D-丙氨酸产生所需的酶量。
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
丝氨酸型 D-Ala-D-Ala 活性测定底物干粉	EC3.4.16.4s	100 T	60 mL 本色瓶
丝氨酸型 D-Ala-D-Ala 活性测定显色液	EC3.4.16.4c	50 mL	50 mL 棕色瓶
丝氨酸型 D-Ala-D-Ala 活性测定反应液	EC3.4.16.4r	50 mL	60 mL 本色瓶
D-丙氨酸干粉	CAS:338-69-2	100 T	15 mL 本色瓶
使用手册	EC3.4.16.4sc	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

待测样本、样本缓冲液、分光光度计、1 mL 比色皿

使用方法

一、首次使用本试剂盒时配制下列溶液

1. 配制丝氨酸型 D-Ala-D-Ala 活性测定底物液：将 40 mL 丝氨酸型 D-Ala-D-Ala 活性测定反应液加入到装有丝氨酸型 D-Ala-D-Ala 活性测定底物干粉的瓶中，颠倒摇晃 20 次溶解，得丝氨酸型 D-Ala-D-Ala 活性测定底物液。
2. 配制 1 mM D-丙氨酸溶液：将 10 mL 丝氨酸型 D-Ala-D-Ala 活性测定反

应液加入到装有 D-丙氨酸干粉的瓶中，颠倒摇晃 20 次溶解，得 1 mM D-丙氨酸溶液。

二、待测样本的制备

3. 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 7.2。注意：由于 Mg^{2+}、Mn^{2+}和吡哆醛-5'-磷酸会严重影响丝氨酸型 D-Ala-D-Ala 羧肽酶活性，故样本中不得含有这些物质。同时，由于本试剂盒测定的是 D-丙氨酸，故样本中也不得有 D-丙氨酸的成分。
4. 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。
5. 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

6. 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。
7. 标记 1-6 个 1.5 mL 离心管，每个管中加入 0.7 mL 超纯水。
8. 将第 2 步制备的 1 mM D-丙氨酸溶液为 1 号管样品。
9. 2 号管中加入 0.7 mL 在第 2 步制备的 1 mM D-丙氨酸溶液，充分震荡 1 分钟，得 0.5 mM D-丙氨酸溶液。放冰上待用。
10. 换枪头，在 3 号管中加入 0.7 mL 0.5 mM D-丙氨酸溶液（上步稀释所得），充分震荡 1 分钟，得 250 μM D-丙氨酸溶液。放冰上待用。
11. 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

12. 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。
13. 按下表加入各成分：

成分	阴性对照	N 个样本管	6 个标曲管
各梯度的 D-丙氨酸溶液	不加	不加	各 450 μL
丝氨酸型 D-Ala-D-Ala 活性测定底物液	450 μL	各 450 μL	不加
丝氨酸型 D-Ala-D-Ala 活性测定显色液	450 μL	各 450 μL	各 450 μL
涡旋振荡 30 秒混匀，迅速加入下列成份后开始计时			
自备样本溶解液	100 μL	各 80 μL	各 100 μL
N 个自备待测样本	不加	各 20 μL	不加
总体积	1 mL	1 mL	1 mL

	混合均匀 37℃保温 30 min，沸水浴灭活 10 min 14. 冷却到室温后迅速用分光光度计在 570 nm 测定 OD，测前用蒸馏水调零。 **五、数据分析** 15. 计算真实 OD570 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 16. 制备标准曲线：以 D-丙氨酸溶液的浓度为横轴，以其真实 OD570 光吸收为纵轴，绘制标准曲线。 17. 根据计算公式，用 N 个样本的 OD570 数据计算出其所对应的 D-丙氨酸浓度。根据丝氨酸型 D-Ala-D-Ala 羧肽酶活性的定义(每分钟产生 2 μmol D-丙氨酸所需要的酶量为 1 个单位）计算出酶的活性。 18. 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** 19. 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	D-氨基酸 N-乙酰转移酶活性测定试剂盒