天净沙系列

CAT#:EC3.5.1.28

低温运输，-20℃保存

天净沙

N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶活性测定试剂盒

N-Acetylmuramoyl-L-Alanine Amidase 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 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶（N-Acetylmuramoyl-L-Alanine Amidase，EC3.5.1.28）活性。其原理是 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶催化 4-硝基苯胺盐酸盐-L-丙氨酸释放出的 4-硝基苯胺，4-硝基苯胺在 405 nm 处有特征光吸收，故可通过测定溶液在 405 nm 处光吸收降低的量间接计算酶活性。

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-0.77 U 之间。
3. 本试剂盒 1 个酶活性单位的定义是在 37℃ pH 8.0 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 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶底物分子的转化将产生 1 个 4-硝基苯胺分子，故 1 个酶活性单位相当于在 37℃ pH 8.0 的条件下每分钟催化 1 μmol 4-硝基苯胺产生所需的酶量。
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

本产品采用小扁盒包装

成份	编号	规格	包装
N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶活性测定反应液	EC3.5.1.28r	115 mL	125 mL 本色瓶
N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶活性测定底物干粉	EC3.5.1.28s	100 T	125 mL 本色瓶
4-硝基苯胺干粉	CAS:70967-90-7	100 T	10 mL 棕色瓶
使用手册	EC3.5.1.28sc	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，缓冲液，超纯水，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 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶活性测定底物液：将 100 mL N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶活性测定反应液加入装有 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶活性测定底物干粉的瓶中，颠倒摇晃 20 次溶解，得 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶活性测定底物液。
2. 配制 1 mM 4-硝基苯胺溶液：将 10 mL N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶活性测定反应液加入装有 4-硝基苯胺干粉的瓶中，颠倒摇晃 20 次溶解，得 1 mM 4-硝基苯胺溶液。

3. 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、制备待测样本

4. 用自选方式制备待测样本，样本溶于缓冲液中。注意：由于 Zn2+、Ca2+、Mg2+等金属离子和 EDTA 等物质会严重影响 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶活性，故样本中不得含有这些物质。同时，由于本试剂盒测定的是 4-硝基苯胺，故样本中也不得有 4-硝基苯胺的成分。
5. 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。
6. 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

7. 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。
8. 标记 1-6 个 1.5 mL 离心管，每个管中加入 0.7 mL 超纯水。
9. 将本试剂盒提供的 1 mM 4-硝基苯胺溶液为 1 号管样品。
10. 2 号管中加入 0.7 mL 的 1 mM 4-硝基苯胺溶液，充分震荡 1 分钟，得 0.5 mM 4-硝基苯胺溶液。放冰上待用。
11. 换枪头，在 3 号管中加入 0.7 mL 0.5 mM 4-硝基苯胺溶液（上步稀释所得），充分震荡 1 分钟，得 250 μM 4-硝基苯胺溶液。放冰上待用。
12. 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、1 mL 体系 1 cm 光径比色皿测定

13. 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：
14. 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	20 μL	20 μL
N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶活性测定底物液	各 980 μL	980 μL	不加
N 个自备待测样本	各 20 μL	不加	不加
各梯度的 4-硝基苯胺溶液	不加	不加	各 980 μL
总体积	1 mL	1 mL	1 mL
混合均匀 37℃下反应 30 min			

15. 迅速用分光光度计在 405 nm 测定 OD，测前用蒸馏水调零。

五、数据处理

16. 计算真实 OD405 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。 17. 制备标准曲线：以 4-硝基苯胺溶液的浓度为横轴，以其真实 OD405 光吸收为纵轴，绘制标准曲线。 18. 根据计算公式,用 N 个样本的 OD405 数据计算出其所对应的 4-硝基苯胺浓度。根据 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶活性的定义（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。 19. 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。 **四、96 孔板检测** 20. 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	Skygen 3-磷酸甘油酸磷酸酶活性测定试剂盒