天净沙系列

CAT#:EC4.2.1.79

低温运输，2-8℃保存

天净沙

2-甲基柠檬酸脱水酶活性测定试剂盒

2-Methylcitrate Dehydratase Assay Kit

使用手册 V0.502

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 2-甲基柠檬酸脱水酶（2-Methylcitrate Dehydratase，PrpD，EC4.2.1.79）活性。其原理是该酶可以催化底物 2-甲基柠檬酸转变成产物 2-甲基顺乌头酸，后者在 240 nm 处有特征光吸收，故通过监测吸光度在 240 nm 处随时间的升高，即可计算酶活性。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 0.0156 U，线性范围在 0.0313 U-0.1 U 之间。
3. 本试剂盒 1 个酶活性单位的定义是在 25℃ pH 6.7 的条件下，每分钟能生成 1 μmol 产物所需的酶量。注意：同一 EC 号下面的酶可能有不同的最适反应条件。本产品的基于酵母 PrpD 的最适反应体系开发。如果用户所需最适反应体系与之不同，可联系本公司定做。
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. 本产品的起始材料是酶抽提物。本试剂盒不包括酶抽提试剂。如果有需要可联系本公司另购。
6. 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
PrpD 底物干粉	EC4.2.1.79s	100 T	125 mL 本色瓶
PrpD 反应液	EC4.2.1.79r	110 mL	125 mL 本色瓶
100 μM 产物标曲液	EC4.2.1.79sd	5 mL	5 mL 本色瓶
使用手册	EC4.2.1.79sc	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

超纯水，酶抽提液，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需配制下列溶液。除试剂盒成份名外，以下 PrpD 全部简称为酶。

1. 配制含底物的酶反应液：将 100 mL 试剂盒提供的 PrpD 反应液加入到装有 PrpD 底物干粉的瓶中，颠倒摇晃 20 次溶解，得 100 mL 含底物的酶反应液。放冰上待用。
2. 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、酶抽提物的制备

3. 用自选方式制备酶抽提物（以下简称样本），记录下样本总体积 V mL 便于后

续计算酶比活性。所用酶抽提液的 pH 值最好为酶反应的最适 pH，否则将样本加入到反应体系中时，反应体系的 pH 可能会偏离最适 pH；样本中不得含 Pb2+、Hg2+、Cu2+等金属离子和 EDTA、草酸盐、柠檬酸盐等化合物，因为它们会抑制酶活性；样本中也不得含有高浓度的产物。

4. 预留 100 μL 样本（N 个样中随机取一个），100℃水浴 10 分钟灭活其中的酶，放冰上待用作酶反应时的酶阴性对照。如果酶耐热，不能热灭活，则用酶抽提液替代。
5. 用自备试剂测定样本的蛋白浓度，以备后续计算比活时使用。

三、标曲制备（以 6 个浓度梯度的产物标曲液为例）

6. 标记 0-6 号共 7 个 2 mL 离心管，并在 0-5 号管中加入 1 mL 试剂盒提供的 PrpD 反应液，只 6 号管不加。
7. 在 6 号管中加入 1 mL 试剂盒提供的产物标曲液。
8. 在 5 号管中也加入 1 mL 试剂盒提供的产物标曲液，充分震荡 1 分钟，由于管中已经有 1 mL 反应液，故得 50 μM 产物标曲液。
9. 在 4 号管中加入 1 mL 5 号管中的产物标曲液，充分震荡 1 分钟，得 25 μM 产物标曲液。
10. 在 3 号管中加入 1 mL 4 号管中的产物标曲液，充分震荡 1 分钟，得 12.5 μM 产物标曲液。
11. 重复上面的操作直到得到 1 号管的产物标曲液。0 号管不需要加入 1 号管的产物标曲液。最后所得 0-6 号管产物标曲液中底物浓度分别为 0、3.13 μM、6.25 μM、12.5 μM、25 μM、50 μM 和 100 μM，各 1 mL，待用。
12. 将分光光度计开机，预热 30 分钟后用超纯水调零。
13. 测定 7 个产物标曲液的 OD240 光吸收（以下简称 A 值），每个测定三次。
14. 数据处理：计算 0-6 号产物标曲液的平均 A 值，然后用每个的 A 值减去 0 号的 A 值即得 7 个产物标曲液的真实 A 值。
15. 绘制标曲：以产物标曲液的浓度为横轴，以 A 值为纵轴，绘制标准曲线并得到标曲方程式 C=aA+b。C 为产物浓度，A 为 A 值。
16. 此公式可在后续计算中使用，不需要每次再做标曲，但必须在后续实验中设置 1-2 个质控点随样本一起测试。质控点样本的制备同产物标曲液的制备，只是其浓度必须在标曲的线性范围内，并且最好跟 7 个产物标曲液的浓度不同。此浓度称为配制浓度。测试后将质控点的 A 值代入到标曲公式得到其计算浓度。如果质控点的计算浓度和配制浓度差异在 10%以内，则可以用标曲公式计算其

余样本。如果差异大于 10%，则需在测试样本时同步制备新的标曲。

四、样本测定

17. 按下表设置酶反应。

成分	阴性对照管	N 个样本管	1-2 个质控点管
含底物的酶反应液（来于第 1 步）	980 μL	各 980 μL	不加
酶阴性对照（来于第 4 步）	20 μL	不加	不加
质控点样本	不加	不加	各 1 mL
N 个样本	不加	各 20 μL	不加

18. 快速混匀 30 秒后放 25℃并计时。如果仪器可以在线保温和自动连续测定，可以每 1 分钟采集 1 次 A 值共 30 分钟。如果仪器只能手动测定，则每 5 分钟测定 1 次 A 值，测定后在返回 25℃继续保温。如此循环，直到每个样本获得 6 个时间点的 A 值。

五、数据处理

19. 计算△A/min 测定值：以时间为横轴，以 A 值为纵轴，绘制反应速率曲线，然后选择线性区域的△A/min 为测定值。阴性对照也需要计算此值。
20. 计算△A/min 真实值=待测样本△A/min 测定值-阴性对照△A/min 测定值。
21. 将上步所得ΔA/min 真实值中的ΔA 值导入到 C=aA+b 公式中，求出在 1 mL 反应体系中每分钟底物浓度变化值ΔC。
22. 由于酶反应体积为 1 mL，浓度单位为μM，故按 1 μM×1 mL=0.001 μmol 可计算出 1 mL 反应体系中每分钟底物变化的μmol 数值，用 N μmol 表示。
23. 根据酶活性的定义（每分钟生成 1 μmol 产物所需要的酶量为 1 个单位），故反应体系中的酶活性单位数为 N 单位。反应体积为 1 mL，故反应体系中酶浓度为 N/mL。
24. 计算样本中的酶浓度：由于反应体系中的酶是样本中的酶稀释 50 倍而得（20 μL 样本加入到 1 mL 反应系统中），故样本中酶的浓度为 50 N/mL。
25. 计算样本的酶比活性：样本总体积 V mL × 酶浓度 50 N/mL = 样本总酶单位数 50 NV。样本总体积 × 蛋白浓度 = 样本总蛋白量（以 mg 为单位）。样本酶比活 = 50 NV/总蛋白量（单位 U/mg）。

六、96 孔板检测

26. 操作同上，只是在设置反应时，反应总体积为 0.25 mL，故按第 17 步反应表设置反应时，各成份的用量需要×25%；按第 23 步公式计算反应体系中酶浓

度时，反应体积也应该相应地将 1 mL 改成 0.25 mL。

附：消光系数法

在大规模筛选时，如果知道产物的消光系数，还可以选择更加快捷、不需要制备标曲的消光系数法测定酶活性。但由于测定底物消光系数所用的缓冲体系跟酶测定所用的反应体系可能不同，结果可能有误差。用户如果选择使用消光系数法，建议先用两种方法同时测定一个样本。如果结果差异大，则只能使用标曲法。如果差异可以接受，则可使用消光系数法。在操作上，两法的差异是从样本测定开始，故此处略去样本测定前的操作步骤。

九、消光系数法的样本测定

27. 按下表设置反应。

成分	阴性对照管	N 个样本管
含底物的酶反应液 (来于第 1 步)	980 μL	各 980 μL
酶阴性对照 (来于第 4 步)	20 μL	不加
N 个待测样本	不加	各 20 μL

28. 同第 18 步。

十、数据处理

29. 计算△A/min 测定值：同第 19 步。

30. 计算△A/min 真实值：同第 20 步。

31. 将△A 换算成每分钟产物浓度升高：根据朗伯-比尔定律，A = εlC = 消光系数*光径*浓度，故所测产物浓度升高值△C = △A/εl。假设消光系数ε = X/cm*M，比色皿光径为 1 cm，故产物浓度升高值△C = △A/[(X/cm*M)*1cm] = (△A M/X)。由于 M = mol/L，故△C = (△A mol/X L) = (△A mmol/X mL) = (△A *1000 μmol/X mL) = 1000△A/X (单位 μmol/mL)。

32. 酶反应体积为 1 mL，故在反应体系里每分钟产物升高的μmol 数=△C μmol/mL*1 mL = △C μmol = 1000△A/X μmol。

33. 根据酶活性的定义（每分钟生成 1 μmol 产物所需要的酶量为 1 个单位），故反应体系中的酶浓度为 1000△A/X 个酶活力单位。本试剂盒产物的消光系数为 4500，代入即得数值。

34. 计算样本中的酶浓度：同第 24 步。

35. 计算样本的酶比活性：同第 25 步。

	十一、96 孔板检测 36. 操作同上，只是在第 27 步设置反应时，反应总体积为 0.25 mL 而不是 1 mL，故各成份的用量需要×25%；按第 31 步使用公式△A/（消光系数*光径）时需要使用所用 96 孔板的光径（需要询问 96 孔板厂家确认）；按第 33 步公式计算反应管中酶浓度时，反应体积也应该相应地将 1 mL 改成 0.25 mL。
关联产品	2-甲基柠檬酸脱水酶抽提试剂盒