天净沙系列

CAT#:EC3.4.22.38f

低温运输，-20℃保存

天净沙

组织蛋白酶 K 活性测定试剂盒（荧光法）

Cathepsin K 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

本产品用于测定组织蛋白酶 K（Cathepsin K，CTSK，EC3.4.22.38，CAS: 94716-09-3）活性。其原理是该酶可以催化底物 Z-Phe-Arg-AMC 分解产生产物 AMC，后者在 365 nm 激发产生 530 nm 荧光，故通过监测 365 nm 激发光/530 nm 发射光下荧光值随时间的升高，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. 提供 CTSK 阳性对照，便于在遇到问题时分析原因。
3. 最低检测限为 0.0208 U，线性范围在 0.417 U-0.66 U 之间。
4. 本试剂盒 1 个酶活性单位的定义是在 37℃ pH 5.5 的条件下，每分钟能生成 1 nmol 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。本产品的基于人 CTSK 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。
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。
7. 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
CTSK 底物干粉（荧光法）	EC3.4.22.38f-s	100 T	125 mL 棕色瓶
CTSK 反应液（荧光法）	EC3.4.22.38f-r	110 mL	125 mL 本色瓶
CTSK 阳性对照，0.5mg/mL	CAS:94716-09-3	5 T	0.5 mL 红盖管
20 μM 产物标曲液（荧光法）	EC3.4.22.38f-sd	10 mL	10 mL 棕色瓶
使用手册	EC3.4.22.38sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃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可测 365 nm 激发光/530 nm 发射光的荧光光度计，96 孔板及与之匹配的可测 365 nm 激发光/530 nm 发射光的荧光光度计。

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 CTSK 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 CTSK 反应液（荧光法）加入到装有 CTSK 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 Cu2+、Mg2+等金属离子，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 CTSK 反应液（荧光法），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（荧光法）。
8. 在 5 号管中也加入 1 mL 试剂盒提供的产物标曲液（荧光法），充分震荡 1 分钟，由于管中已经有 1 mL 反应液，故得 10 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 5 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 2.5 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、0.625 μM、1.25 μM、2.5 μM、5 μM、10 μM 和 20 μM，各 1 mL，待用。
12. 将荧光光度计开机，预热 30 分钟后用超纯水调零。
13. 测定 7 个产物标曲液在 365 nm 激发光/530 nm 发射光条件下的荧光值（以下简称 R 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 R 值，然后用每个的 R 值减去 0 号的 R 值即得 7 个产物标曲液的真实 R 值。
15. 绘制标曲：以产物标曲液的浓度为横轴，以 R 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 R 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 R 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。阳性对照可以在实验遇到问题需要查找原因时才使用。

成分	阴性对照管	阳性对照管	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	980 μL	各 980 μL	不加
酶阴性对照（来于第 5 步）	20 μL	不加	不加	不加
酶阳性对照（来于第 2 步）	不加	20 μL	不加	不加
质控点样本	不加	不加	不加	各 1 mL
N 个样本	不加	不加	各 20 μL	不加

18. 快速混匀 30 秒后放 37℃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 R 值共 30 分钟。如果仪器只能手动测定，则每 5 分钟测定 1 次 R 值，测定后在返回 37℃继续保温。如此循环，直到每个样本获得 6 个时间点的 R 值。

五、数据处理

19. 计算△R/min 测定值：以时间为横轴，以 R 值为纵轴，绘制反应速率曲线，然后选择线性区域的△R/min 为测定值。阴性对照也需要计算此值。
20. 计算△R/min 真实值=待测样本△R/min 测定值-阴性对照△R/min 测定值。
21. 将上步所得△R/min 真实值中的ΔR 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。试剂盒

	提供的酶阳性对照的浓度为 0.58 U/mL 左右，如果通过测定得到的酶阳性对照的浓度跟此数字相差过大，请跟本公司联系。 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 18 步反应表设置反应时，各成份的用量需要×25%；按第 24 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。
关联产品	CTSK 抽提试剂盒