天净沙系列

CAT#:EC5.1.2.1IF

低温运输，-20℃保存

天净沙

乳酸消旋酶抑制剂荧光法筛选试剂盒

Lactate Racemase Inhibitor Fluorometric Screening Kit

使用手册 V0.55

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

本产品是乳酸消旋酶（Lactate Racemase，LarA，EC5.1.2.1）抑制剂筛选试剂盒。其原理是荧光标记底物和乳酸消旋酶反应后在 360 nm 波长激发下产生 460 nm 荧光，通过检测荧光值变化来测定抑制剂的强弱。本产品具有如下特点：

1. 即开即用，用户不需要单独购买每个成分并优化最佳用量。
2. 使用便捷，整个实验可以在 2 小时内完成。
3. 96 孔板模式，尤其适合高通量检测。不适合比色皿检测。
4. 提供重组 LarA 和一个竞争性抑制剂作为对照。
5. 可以用于 LarA 抑制剂或激活剂的筛选，还可以用于测定其 IC50。
6. 本产品足够 100 次 96 孔板测定实验，每次 40 μL 反应体系。
7. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品采用塑料袋包装

成份	编号	规格	包装
LarA 荧光底物液	EC5.1.2.1fs	2 mL	2 mL 棕色管
2×LarA 荧光反应液	EC5.1.2.1fr	25 mL	30 mL 本色瓶
LarA 酶溶液	5-EC5.1.2.1	1 mL	1.5 mL 红盖管
10 mM LarA 抑制剂溶液	EC5.1.2.1ih	20 μL	1.5 mL 绿盖管
使用手册	scEC5.1.2.1IF	1 份	无

运输及保存

低温运输、-20℃保存，LarA 酶溶液和其荧光底物液需-80℃保存，有效期半年。

自备试剂

待测样品，超纯水，96 孔板（跟所用的荧光光度计兼容），可在 360 nm 激发光 460 nm 发射光下检测的荧光光度计。

使用方法

一、抑制剂筛查

1. 首次使用本试剂盒时将所有 LarA 荧光底物液转移到 2×LarA 荧光反应液中，轻柔颠倒 20 次混匀后得到含荧光底物的反应液。没用完的此溶液需要放-20℃保存。
2. 配制 4×待测抑制剂溶液：将待测抑制剂用自备的、合适的溶剂（水或 DMSO 等有机溶剂）配制成 1 mM 浓缩液，再将其稀释到比测定浓度高 4 倍的浓度（相当于 4×）待用。如果首次实验不知道待测浓度，建议选择 10 μM 为测定浓度，则其 4 倍为 40 μM 的溶液。下面以配制 100 μL 40 μM 抑制剂为例（足够 10 次反应）：在 1.5 mL 离心管中先后加入 4 μL 1 mM 抑制剂浓缩液、50 μL 2×LarA 荧光反应液和 46 μL 超纯水，涡旋振荡混匀即得 40 μM 的 4×待测抑制剂溶液，没用完的此溶液可以放-20℃保存。
3. 如果溶解抑制剂的是有机溶解，则可计算出上步所得 40 μM 抑制剂溶液中有

机溶剂的浓度是 4%，故需配制 100 μL 4%该有机溶剂作为对照，配制方法是：在一离心管中加入 4 μL 自备有机溶剂、50 μL 2×LarA 荧光反应液和 46 μL 超纯水。此为无抑制剂有机溶剂对照。没用完的此溶液可以放-20℃保存。如果是用水溶解抑制剂，则此溶液用水替代。

4. 配制 100 μM 的抑制剂阳性对照 100 μL：在离心管中加入 1 μL 本试剂盒提供的 10 mM 的 LarA 抑制剂溶液、50 μL 2×LarA 荧光反应液和 49 μL 超纯水，涡旋振荡混匀。此为 LarA 抑制剂阳性对照。没用完的此溶液可以放-20℃保存。

5. 设置反应：在 96 孔板的各反应孔中按下表加入各成分，反应总体积为 40 μL。

成分	空白孔	溶剂对照孔	抑制剂孔	N 个待测孔
LarA 酶溶液	不加	10 μL	10 μL	各 10 μL
2×LarA 荧光反应液	10 μL	不加	不加	不加
自备超纯水	10 μL	不加	不加	不加
有机溶剂对照（第 3 步）	不加	10 μL	不加	不加
100 μM 抑制剂阳性对照（第 4 步）	不加	不加	10 μL	不加
N 个 100 μM 待测抑制剂	不加	不加	不加	各 10 μL

6. 在轻柔摇晃中 25℃保温 30 分钟，让抑制剂和酶充分结合。

7. 在每个孔中加入 20 μL LarA 荧光底物液，在轻柔摇晃中 25℃保温 30 分钟

8. 保温结束后在 360 nm 激发波长和 460 nm 发射波长下进行荧光测定。

9. 计算抑制率：抑制率 = [1 - (抑制剂孔荧光值 - 空白孔荧光值)/(无抑制剂孔荧光值-空白孔荧光值)] × 100%。本试剂盒提供的 LarA 抑制剂的抑制率为 50%左右。

10. 对在初筛实验中抑制率达到期望值的抑制剂，可复测确定后再再按下面操作测定其 IC50。

二、测定抑制剂的 IC50

11. 第一次测 IC50 前建议先测出该抑制剂的完全抑制浓度和完全不抑制浓度，然后在两者之间选择 5 个浓度（相邻浓度差最好为 5-10 倍）进行 IC 测定。测出第一个 IC50 后，再在其上下各选 3 个浓度（相邻浓度差最好为 2-5 倍）再次测定。最终 IC50 以第二次测定的为准。两次测定均按下述步骤操作进行。

12. 配制浓度 4 倍于选定浓度的 4×抑制剂溶液。如果要测 0.1，1，10，100，1000 μM 五个浓度，则配制浓度为 0.4，4，40，400，4000 μM 的 4×抑

制剂溶液待用。

13. 配制有机溶剂对照：配制跟上步各溶液中有机溶剂浓度一样的一组有机溶剂对照。如果在第 2 步是用水配制的抑制剂浓缩液，则跳过此步。并且在第 15 步不做无抑制剂孔。
14. 计算反应数：若有 N 个抑制剂，每个测 5-7 个浓度，每个浓度 1 次重复，加 1 个是空白对照，则需设置的总反应数 = 2N × （5 到 7）+ 1。
15. 根据总反应数，在 96 孔板的各反应孔中分配相应微孔，并按下表在孔中加入各成分，反应总体积为 40 μL。

成分	空白孔	5-7 个 溶剂对照孔	5-7 个 抑制剂孔
LarA 酶溶液	不加	各 10 μL	各 10 μL
2×LarA 荧光反应液	10 μL	不加	不加
自备超纯水	10 μL	不加	不加
5-7 个浓度的溶剂对照（第 13 步）	不加	各 10 μL	不加
5-7 个浓度的抑制剂（第 12 步）	不加	不加	各 10 μL

16. 在摇晃中 25℃保温 30 分钟，让抑制剂和酶充分结合。
17. 在每个孔中加入 20 μL 含 GSH 的 LarA 荧光底物液，在摇晃中 25℃保温 30 分钟。
18. 保温结束后在 360 nm 激发波长和 460 nm 发射波长下进行荧光测定。
19. 计算抑制率：抑制率 = [1 - (抑制剂孔荧光值 - 对应的无抑制剂孔荧光值)/(对应的无抑制剂孔荧光值 - 空白孔荧光值)] × 100%。如果是用水配制的浓缩液，则用空白孔就是溶剂对照孔。
20. 使用 Excel 或 GraphPad Prism 等软件计算 IC50。
21. 如果 IC50 小于 1 μM，归为强抑制剂，在 1-10 μM 之间属于中等抑制剂，大于 10 μM 属于弱抑制剂。小于 5 μM 均为理想抑制剂。
22. 本试剂盒提供的 LarA 溶液的酶活性为 143.7 U/mL，浓度为 10 μg/mL。
23. 如果实验失败，则需用本试剂盒提供的 LarA 抑制剂测试找原因：用含 1×LarA 荧光反应液将本试剂盒提供的 10 mM LarA 抑制剂溶液稀释得 5 个浓度（25、50、100、200、400 μM）或 7 个浓度（再加 12.5 和 800 μM），然后测定 IC50。如果 IC50 在 20-30 μM 之间，说明试剂盒正常。如果不在此范围，请跟厂家联系。

关联产品 乳酸消旋酶活性测定试剂盒