天净沙系列

CAT#:EC3.1.4.17IF

低温运输和保存

天净沙

# 3’,5’-环核苷酸磷酸二酯酶抑制剂荧光法筛选试剂盒

3',5'-Cyclic-Nucleotide Phosphodiesterase Inhibitor Screening 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

本产品是 3’,5’-环核苷酸磷酸二酯酶（3',5'-Cyclic-Nucleotide Phosphodiesterase，PDE，EC3.1.4.17）抑制剂筛选试剂盒。其原理是荧光标记底物和 3’,5’-环核苷酸磷酸二酯酶反应后在 355 nm 波长激发下产生 440 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 PDE 和一个竞争性抑制剂作为对照。
5. 可以用于 PDE 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 |
|---|---|---|---|
| PDE 荧光底物液 | EC3.1.4.17IFfs | 2 mL | 2 mL 棕色管 |
| PDE 荧光反应液 | EC3.1.4.17IFfr | 25 mL | 30 mL 本色瓶 |
| PDE 酶溶液 | 5-EC3.1.4.17 | 1 mL | 1.5 mL 红盖管 |
| 10 mM PDE 抑制剂溶液 | EC3.1.4.17IFih | 20 μL | 1.5 mL 绿盖管 |
| 使用手册 | scEC3.1.4.17IF | 1 份 | 无 |

## 运输及保存

低温运输、-20℃保存，PDE 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 355 nm 激发光 440 nm 发射光下检测的荧光光度计。

## 使用方法

**一、抑制剂筛查**

1. 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 PDE 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。
2. 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 PDE 荧光反应液和 46 μ

L 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。

3. 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 PDE 抑制剂溶液、50 μL PDE 荧光反应液和 49 μL 超纯水，涡旋振荡混匀。此为 PDE 抑制剂阳性对照。没用完的此溶液可以放-20℃保存。

4. 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 |
|---|---|---|---|---|
| PDE 酶溶液 | 不加 | 10 μL | 10 μL | 各 10 μL |
| PDE 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<br>(第 2 步) | 不加 | 10 μL | 不加 | 不加 |
| 100 μM 抑制剂阳性对照<br>(第 3 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 |

5. 在轻柔摇晃中 25℃保温 10 分钟，让抑制剂和酶充分结合。

6. 在每个孔中加入 20 μL PDE 荧光底物液，在轻柔摇晃中 25℃保温 20 分钟，58℃保温 5 分钟灭活酶。

7. 保温结束后在 355 nm 激发波长和 440 nm 发射波长下进行荧光测定。

8. 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 PDE 抑制剂的抑制率为 50%左右。

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

**二、测定抑制剂的 IC50**

10. 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。

11. 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。

12. 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 1 步是用水配制的抑制剂浓缩液，则跳过此步。并且在第 14 步不做无抑制剂孔。

13. 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。
14. 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<br>溶剂对照孔 | 5-7 个<br>抑制剂孔 |
|---|---|---|---|
| PDE 酶溶液 | 不加 | 各 10 μL | 各 10 μL |
| PDE 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 12 步） | 不加 | 各 10 μL | 不加 |
| 5-7 个浓度的抑制剂（第 11 步） | 不加 | 不加 | 各 10 μL |

15. 在摇晃中 25℃保温 10 分钟，让抑制剂和酶充分结合。
16. 在每个孔中加入 20 μL 含 DTT 的 PDE 荧光底物液，在摇晃中 25℃保温 20 分钟，58℃保温 5 分钟灭活酶。
17. 保温结束后在 355 nm 激发波长和 440 nm 发射波长下进行荧光测定。
18. 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。
19. 使用 Excel 或 GraphPad Prism 等软件计算 IC50。
20. 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。
21. 本试剂盒提供的 PDE 溶液的浓度为 10 μg/mL。
22. 如果实验失败，则需用本试剂盒提供的 PDE 抑制剂测试找原因：用 PDE 荧光反应液将本试剂盒提供的 10 mM PDE 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 50-150 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**

3',5'-环核苷酸磷酸二酯酶活性测定试剂盒