天净沙系列

CAT#:EC1.14.11.2

低温运输，-20℃保存

天净沙

前胶原-脯氨酸 4-双加氧酶活性测定试剂盒

P4H Assay Kit

使用手册 V0.59

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

本产品用于测定前胶原-脯氨酸 4-双加氧酶（P4H，Procollagen-proline 4-dioxygenase，EC1.14.11.2）活性。其原理是该酶可以催化特异反应，其产物之一与显色液反应生成在 560 nm 波长下有特征光吸收的物质，故以之为测定物，它在该波长下的光吸收变化速度可反映产物在反应中的转换速度，由此可测定 P4H 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 0.1 U，线性范围在 0.2-10 U 之间。
3. 本试剂盒 1 个酶活性单位的定义是在最适反应条件下，让产物每分钟产生 1 μmol 变化所需的酶量。注意：同一 EC 号下面的各种酶可能有不同的最适反应条件，本产品是基于大肠杆菌 P4H 的最适反应条件开发。如果用户所测酶的最适反应条件与之不同，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制备好的待测样本。本试剂盒不包括样本制备试剂，如果有需要可联系本公司另购。
6. 基于非连续测定，提供校准曲线法和消光系数法两种操作流程。
7. 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
P4H 底物干粉	EC1.14.11.2s	100 T	100 mL 本色瓶
P4H 反应液	EC1.14.11.2r	110 mL	125 mL 本色瓶
P4H 干粉	28-EC1.14.11.2	5 T	0.5 mL 红盖管
通用酶储存液	7-251207	0.5 mL	0.5 mL 本色管
产物反应液	EC1.14.11.2d	50 mL	60 mL 棕色瓶
氧化剂	EC1.14.11.2e	50 mL	60 mL 棕色瓶
显色液	EC1.14.11.2c	50 mL	60 mL 棕色瓶
1 mM 产物标曲液	EC1.14.11.2sd	5 mL	5 mL 本色瓶
使用手册	EC1.14.11.2sc	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，样本溶解液，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需要制备下列溶液。以下除试剂盒成份外，P4H 简称为酶。

1. 含底物的酶反应液：转移 10 mL P4H 反应液到一新的试剂瓶中作为预留待用，然后将所有 P4H 底物干粉加入到剩下的 100 mL P4H 反应液中，颠倒摇晃 20 次，得 100 mL 含底物的酶反应液。
2. 酶阳性对照：将试剂盒提供的 110 μL 通用酶储存液加入到 P4H 干粉管中，轻柔颠倒 20 次混匀，得酶阳性对照。注意：本试剂盒提供的阳性对照只够 5 次使用，故建议只在首次实验和在遇到问题需要分析原因时才使用。
3. 如果一次实验没有用完上述溶液，需将其放-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，记录下其总体积 V mL 便于后续计算酶比活性。待测样本的 pH 值最好在反应的最适 pH 附近，否则加入到反应中后可能会改变反应的 pH；待测样本中也不得含有高浓度的、在 560 nm 有光吸收的物质，不得含有能抑制 P4H 活性的成份。
5. 预留 100 μL 待测样本（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。此为酶阴性对照。如果酶耐热，不能热灭活，则用制备待测样本时所用的抽提液替代。
6. 用自备试剂测定待测样本的蛋白浓度，以备后续计算酶比活时使用。

三、标曲制备

7. 下面以制备 6 个浓度梯度的标曲液和 1 个空白对照为例。标记 0-6 号共 7 个 2 mL 离心管，并在 0-5 号管中加入 1 mL 第 1 步预留的 P4H 反应液，只 6 号管不加。
8. 在 6 号管中加入 1 mL 试剂盒提供的 1 mM 产物标曲液。
9. 在 5 号管中也加入 1 mL 试剂盒提供的 1 mM 标曲液，充分震荡 1 分钟。由于管中已经有 1 mL 反应液，故得 0.5 mM 标曲液。
10. 在 4 号管中加入 1 mL 5 号管中的标曲液，充分震荡 1 分钟，得 0.25 mM 标曲液。
11. 在 3 号管中加入 1 mL 4 号管中的标曲液，充分震荡 1 分钟，得 0.125 mM 标曲液
12. 重复上面的操作直到得到 1 号管的标曲液（此时 1 号管总体积为 2 mL，分 1 mL，只留 1 mL）。0 号管对照管不需要加入 1 号管的标曲液。最后所得 0-6 号管中标曲液浓度分别为 0、31.3 μM、62.5 μM、125 μM、250 μM、0.5 mM、1 mM，各 1 mL，放 37℃预热待用。
13. 将分光光度计开机预热 30 分钟，然后用超纯水调零。
14. 在 0-6 号管中加入 1 mL 显色液，快速混匀 30 秒后常温放置 30 分钟，取 1 mL 在 560 nm 测光吸收（以下简称 A 值），每个样本测定三次。
15. 数据处理：计算 1-6 号每个样本的平均 A 值，然后用每个样本的 A 值减去 0 号空白对

照的 A 值即得 6 个样本的真实 A 值。

16. 绘制标曲：以标曲液浓度（μM）为横轴，以 A 值为纵轴，绘制标准曲线并得到线性回归方程式 C = aA + b，C 为标曲液浓度，A 为 A 值。

17. 此公式可在后续测试中反复使用，但在后续实验时必须设置 1 个质检点标曲液随待测样本一起测试。质控点标曲液的制备同上，其浓度必须在上步所得标曲的线性范围内，最好异于制备标曲所用的 6 个浓度。如果质控点的测试结果代入上步回归方程式得到的计算浓度跟其配制浓度相差在 10%以内，则可将同组的待测样本 A 值代入公式直接计算其对应的 C 值。如果相差大于 10%，则不能用此方程式，需同步制备新的标曲，得到新的回归方程式，再用其计算待测样本的 C 值。

四、样本测定

18. 如果有 N 个待测样本，每个做 1 次重复，则按下表在 2 mL 试管中设置 N + 3 个反应。酶阳性对照可以在首次实验或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	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 个待测样本	不加	不加	各 20 μL	不加

19. 快速混匀 30 秒后放 37℃恒温水浴孵育 30 min。

20. 孵育结束后，加入 1 mL 产物反应液，密封试管，110℃高温水解 16 h，冷却至室温，离心取上清。

21. 加入 1 mL 氧化剂，室温静置氧化一定时间。

22. 加入 1 mL 显色液，充分混匀后常温放置 30 分钟后在 560 nm 测 A 值。

五、数据处理

23. 计算 A/min 测定值 = 第 10 分钟 A 值/10 分钟。阴性对照也需要计算此值。

24. 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。

25. 将上步所得 A/min 真实值中的 A 值导入到回归方程式 C = aA + b 中，求出在 1 mL 反应体系中测定物每分钟的浓度变化值ΔC（μM）。

26. 由于测定物和酶反应产物之间的摩尔比例为 1:1，故 1 mL 反应体系中底物每分钟的浓度变化值为ΔC（μM）× 1。

27. 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 的换

算关系即可计算出上步产物浓度变化值对应的μmol 数，用 N μmol 表示。

28. 根据酶活性的定义（使酶反应中产物每分钟有 1 μmol 变化量所需的酶量），反应体系中的酶活性单位数为 N。反应体积为 1 mL，故反应体系中酶浓度为 N 单位/1 mL = N 单位/mL。

29. 计算样本中的酶浓度：由于反应体系中的酶是待测样本中的酶稀释 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 = 50*N 单位/mL。试剂盒提供的酶阳性对照的浓度为 1 U/mL 左右，如果通过测定得到的酶阳性对照的浓度跟此值相差过大，请跟本公司联系。

30. 计算样本的酶比活性：样本总体积（V mL，第 4 步）× 酶浓度（50 N 单位/mL，上步）= 样本总酶单位数（50 NV）。样本总体积 × 蛋白浓度（第 5 步）= 样本总蛋白量（单位一般转换成 mg）。待测样本中的酶比活 = 50 NV/总蛋白量（单位/mg）。

六、96 孔板检测

31. 操作同上，只是在设置反应时，各成份的用量需要×25%；在计算时，需将 1 mL 的反应体积改成 0.25 mL，需将 1 cm 的光径改成所用 96 孔板的光径（需询问 96 孔板厂家）。

附：消光系数法

在大规模筛选时，如果知道测定物的消光系数，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。但由于得到测定物消光系数所用的缓冲体系跟本实际盒酶测定所用的反应体系不同，故结果可能有误差较。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。

七、消光系数法的样本测定

32. 按下表设置反应。酶阳性对照可以在首次实验或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
含底物的酶反应液 (来于第 1 步)	980 μL	980 μL	各 980 μL
酶阴性对照 (来于第 5 步)	20 μL	不加	不加
酶阳性对照 (来于第 2 步)	不加	20 μL	不加
N 个待测样本	不加	不加	各 20 μL

33. 快速混匀 30 秒后放 37℃恒温水浴孵育 30 min。

34. 孵育结束后，加入 1 mL 产物反应液，密封试管，110℃高温水解 16 h，冷却至室温，离心取上清。

35. 加入 1 mL 氧化剂，室温静置氧化一定时间。

36. 加入 1 mL 显色液，充分混匀后常温放置 30 分钟后在 560 nm 测 A 值。

八、数据处理

37. 计算 A/min 测定值 = 第 10 分钟 A 值/10 分钟。阴性对照也需要计算此值。

38. 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。

39. 将 A/min 换算成每分钟测定物浓度变化值：根据朗伯-比尔定律，A = εlC = 消光系数*光径*浓度，故测定物浓度变化值△C = △A/εl。测定物消光系数ε = 28000/cm*M，比色皿光径为 1 cm，故测定物浓度变化值△C = △A/[(28000/cm*M)*1cm] = (△AM/28000)。由于 M = mol/L，故△C = (△A mol/28000 L) = (△A mmol/28000 mL) = (△A*1000 μmol/28000 mL) = 1000△A/28000（单位为 μmol/mL）。

40. 由于测定物和酶反应产物之间的摩尔比例为 1:1，故 1 mL 反应体系中底物每分钟的浓度变化值为ΔC（μM）× 1。

41. 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 的换算关系即可计算出上步产物浓度变化值对应的μmol 数，用 N μmol 表示。

42. 根据酶活性的定义（使酶反应中产物每分钟有 1 μmol 变化量所需的酶量），反应体系中的酶活性单位数为 N。反应体积为 1 mL，故反应体系中酶浓度为 N 单位/1 mL = N 单位/mL。

43. 计算样本中的酶浓度：由于反应体系中的酶是待测样本中的酶稀释 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 = 50*N 单位/mL。试剂盒提供的酶阳性对照的浓度为 1 U/mL 左右，如果通过测定得到的酶阳性对照的浓度跟此值相差过大，请跟本公司联系。

44. 计算样本的酶比活性：样本总体积（V mL，第 4 步）× 酶浓度（50 N 单位/mL，上步）= 样本总酶单位数（50 NV）。样本总体积 × 蛋白浓度（第 5 步）= 样本总蛋白量（单位一般转换成 mg）。待测样本中的酶比活 = 50 NV/总蛋白量（单位/mg）。

九、96 孔板检测

45. 操作同上，只是在设置反应时，各成份的用量需要×25%。在计算时，需将 1 mL 的反应体积改成 0.25 mL，需将 1 cm 的光径改成所用 96 孔板的光径（需询问 96 孔板厂家）。

关联产品	前胶原-脯氨酸 4-双加氧酶抽提试剂盒