天净沙系列

CAT#:7-EC3.4.21.79

低温运输，-20℃保存

天净沙

# 颗粒酶 B 活性测定试剂盒

# Granzyme B 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

本产品用于测定颗粒酶 B（Granzyme B，EC3.4.21.79）活性。其原理是该酶可以催化底物 Ac-IEPD-pNA 分解产生产物对硝基苯胺，后者在 405 nm 处有特征光吸收，故通过监测吸光度在 405 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 7.3 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。本产品的基于人颗粒酶 B 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 |
|---|---|---|---|
| 颗粒酶 B 底物干粉 | 7-EC3.4.21.79s | 100 T | 125 mL 本色瓶 |
| 颗粒酶 B 反应液 | 7-EC3.4.21.79r | 110 mL | 125 mL 本色瓶 |
| 100 μM 产物标曲液 | 7-EC3.4.21.79sd | 10 mL | 15 mL 棕色瓶 |
| 使用手册 | 7-EC3.4.21.79sc | 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，以下颗粒酶 B 全部简称为酶。**

1. 配制含底物的酶反应液：将 100 mL 试剂盒提供的颗粒酶 B 反应液加入到装有颗粒酶 B 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+等金属离子和冈田酸，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 试剂盒提供的颗粒酶 B 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 OD405 光吸收（以下简称 A 值），每个测定三次。
14. 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。
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 A = aC + b，C 为标曲液浓度，A 为 A 值。
16. 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**

17. 按下表设置酶反应。

| 成分 | 阴性对照管 | N 个样本管 | 质控点管 |
|---|---|---|---|
| 含底物的酶反应液<br>（来于第 1 步） | 980 μL | 各 980 μL | 不加 |
| 酶阴性对照<br>（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 值导入到回归方程式 A = aC 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）。
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 的换算关系即可计算出ΔC 对应的μmol 数，用 N μmol 表示。
23. 根据酶活性的定义（让测定物每分钟有 1 μmol 变化量所需的酶量），故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。
24. 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。
25. 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 6 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**

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<br>（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 9870，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 1mL 改成 0.25 mL。

| | |
|---|---|
| **关联产品** | 颗粒酶 B 抽提试剂盒 |