天净沙系列

CAT#:7-C53501-90-9

低温运输，2-8℃保存

天净沙

甲基辅酶 M 含量测定试剂盒

Methyl-CoM Assay 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

本产品用于测定甲基辅酶 M（Methyl-CoM，MCM，CAS 53501-90-9）含量。其原理是 MCM 的游离巯基和特异反应物在酶作用下反应生成在 412 nm 处有特征光吸收的物质。以其为测定物，通过检测其吸光度在此波长下的改变即可计算出待测样本中 MCM 含量。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 MCM 阳性对照，便于在遇到问题时分析原因。
3. 适用于检测从各种样本中提取的，或合成的 MCM。
4. 基于游离巯基的特异反应进行检测，故待测样本中不得含有其它带游离巯基的物质，也不得含有在 412 nm 有光吸收的物质。如有上述物质，需预处理去除。如不能去除，则需选用专一性更高的试剂盒。
5. 灵敏度高，最低检测限为 1 μM。
6. 可以定量，线性范围在 400 μM -10 mM 之间。
7. 提供标准曲线法和消光系数法两种操作流程。
8. 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。
9. 本产品只可用于科研。（售前手册仅供参考，具体请以产品出货手册为准）

规格及成分

本产品采用小扁盒包装

成份	编号	规格	包装
MCM 测定液	7-C53501-90-9rx	100 mL	120 mL 本色瓶
MCM 测定反应物干粉	7-C53501-90-9sp	100 T	10 mL 本色瓶
4×MCM 测定显色液	7-C53501-90-9c	30 mL	30 mL 棕塑瓶
酶干粉	7-C53501-90-9en	100 T	2.0 mL 红盖管
酶储存液	7-C53501-90-9st	3 mL	5 mL 本色瓶
10 mM MCM 标曲液	7-C53501-90-9sd	5 mL	5 mL 本色瓶
使用手册	7-C53501-90-9sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，2-8℃保存，有效期一年。

自备试剂

待测样品，样本溶解液，超纯水，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。

1. 配制酶溶液：将 2 mL 酶储存液加入到装有酶干粉的管中，颠倒摇晃 20 次溶解，得 2 mL 酶溶液，放冰上待用。剩下的 1 mL 酶储存液也放冰上待用。
2. 反应物溶液：从装有 100 mL MCM 测定液的瓶中取出 10 mL 到新的离心管或

试剂瓶中待在第 5 步使用，再将 MCM 测定反应物干粉全部加入到剩余的 90 mL MCM 测定液中，颠倒摇晃 20 次溶解，得 3×反应物溶液，放冰上待用。

3. 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、制备待测样本

4. 用自备试剂制备待测样品，记下初始样本用量（如 g 数或 mL 数）。

三、标曲制备（以 6 个浓度梯度的标曲液为例）

5. 标记 0-6 号共 7 个 1.5 mL 离心管，并在 0-5 号管中加入 0.7 mL 第 2 步留存的 MCM 测定液，第 6 号管不加 MCM 测定液。
6. 在 6 号管中加入 0.7 mL 试剂盒提供的 10 mM MCM 标曲液。
7. 在 5 号管中也加入 0.7 mL 试剂盒提供的 10 mM 标曲液，充分震荡 1 分钟，由于管中已经有 0.7 mL 测定液，故得 5 mM 标曲液。
8. 在 4 号管中加入 0.7 mL 5 号管标曲液，充分震荡 1 分钟，得 2.5 mM 标曲液。
9. 在 3 号管中加入 0.7 mL 4 号管标曲液，充分震荡 1 分钟，得 1.25 mM 标曲液。
10. 重复上面的操作直到得到 1 号管标曲液。0 号管不需要加入 1 号管标曲液，故它只含有在第 5 步加入的 0.7 mL MCM 测定液。最后，0-6 号共 7 个管中 MCM 浓度分别为 0、313 μM、625 μM、1.25 mM、2.5 mM、5 mM 和 10 mM。放冰上待用。
11. 将分光光度计开机，预热 30 分钟后用超纯水调零。在预热期间设置按下表标记 6 个 1.5 mL 反应管并按下表加入各成份：

成份	7 个 MCM 标曲管
3×反应物溶液（来于第 2 步）	各 230 μL
7 个 MCM 标曲样本（来于第 10 步）	各 500 μL，1 号样到 1 号管，以此类推
酶溶液（来于第 1 步）	各 20 μL
酶促反应过程需要全程避光且严格无氧，37℃保温 30 分钟后加入下列成份并快速混匀	
4×MCM 测定显色液	各 250 μL

12. 测定每个样本在 412 nm 的光吸收（以下全部简称为 A 值）。
13. 数据处理：将 1-6 号的 A 值分别减去 0 号的 A 值即得各标曲样本的真实 A 值。
14. 绘制标曲：以 1-6 号标曲液 MCM 浓度（单位为μM）为横轴，以每个标曲样本的 A 值为纵轴，绘制标准曲线并得到线性回归方程式 A = a*C + b。C 为标曲液 MCM 浓度（单位为μM），A 为 A 值。
15. 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

个质控点样本随待测样本一起测试。质控点样本的 MCM 浓度必须在上述标的线性范围内，并且最好跟上述 7 个标曲液 MCM 浓度不同。测试后将质控点样本的 A 值代入到上步的方程式得其计算浓度，如果此浓度跟质控点的配制浓度差异在 10%以内，则可以用此公式计算其余待测样本。如果差异大于 10%，则需在测试待测样本时同步制备新的标曲。

四、样本测定

16. 设置反应：在 1.5 mL 离心管中按下表分别加入各成份：

成分	质控点 样本管	N 个待测 样本管
3×反应物溶液（来于第 2 步）	230 μL	各 230 μL
质控点样本	各 500 μL	不加
自备 N 个待测样本	不加	各 500 μL
酶溶液（来于第 1 步）	各 20 μL	各 20 μL
酶促反应过程需要全程避光且严格无氧，37℃保温 30 分钟后加入下列成份		
4×MCM 测定显色液	250 μL	各 250 μL

17. 测定每个样本在 412 nm 的 A 值。

五、数据处理

18. 计算真实 A 值：将各样本的 A 值减去所对应的无酶对照样本的 A 值，即得各样本的真实 A 值。

19. 将真实 A 值导入到 A = a*C + b 公式中，即可计算出待测样本中 MCM 浓度（单位为μM）。如果计算所得的 MCM 浓度在标曲的线性范围外，则对应的样本需要稀释，直到其测得的浓度在标曲的线性范围内。需要记下稀释倍数 N，在计算浓度时需要乘以稀释倍数。此浓度乘以样本体积即得样本中 MCM 的含量。再根据第 4 步记录的初始样本量即可计算出每 g 或每 mL 样本中 MCM 的含量。

六、96 孔板检测

20. 操作同上，只是在设置反应时，反应总体积为 0.25 mL，各成份的用量需要×25%。

附：消光系数法

在大规模筛选或基质比较简单时，还可以选择更加快捷、不需要制备标曲的消光系数法，前提是知道测定物的消光系数。用户如果选择使用消光系数法，建议先用此法和标曲法同时测定同一个样本，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，消光系数法不需要制作标曲，在按第二步制备好样本后，直接进行下面的操作。

七、消光系数法的样本测定

21. 按下表设置反应。

成分	N 个待测样本无酶对照管	N 个待测样本管
3×反应物溶液（来于第 2 步）	各 230 μL	各 230 μL
自备 N 个待测样本	各 500 μL	各 500 μL
酶溶液（来于第 1 步）	各 20 μL	各 20 μL
酶促反应过程需要全程避光且严格无氧，37℃保温 30 分钟后加入下列成份		
4×MCM 测定显色液	250 μL	各 250 μL

22. 测定每个样本在 412 nm 的 A 值。

八、数据处理

23. 计算真实 A 值：将各样本的 A 值减去所对应的无酶对照样本的 A 值，即得各样本的真实 A 值。如果计算所得的 MCM 浓度在标曲的线性范围外，则对应的样本需要稀释，直到其测得的浓度在标曲的线性范围内。需要记下稀释倍数 N，以便在下步计算浓度时使用。

24. 将真实 A 值换算成测定物浓度：根据朗伯-比尔定律 A = εlC，测定物在 412 nm 的消光系数ε = N/cm*M，比色皿光径 l = 1 cm，则测定体系中测定物的浓度 C = A/εl = A/（N/cm*M）* 1 cm = A/N (单位为 M，非μM)。将测定物的消光系数（去除单位后）13600 代入此公式即得测定体系中测定物的浓度。由于测定物的浓度改变跟 MCM 的浓度改变是 1:1 的关系，故测定体系中测定物浓度除以 1 即是测定体系中 MCM 的浓度。测定体系中待测样本的体积占总体积的一半（1 mL 测定体系中加入的待测样本体积为 500 μL），故待测样本中 MCM 浓度 = 测定体系中 MCM 浓度 × 2。如果在上步还有稀释处理，则再乘以稀释倍数 N，得到待测样本中 MCM 的浓度。此浓度乘以体积即得样本中 MCM 的含量。再根据第 4 步记录的初始样本量即可计算出每 g 或每 mL 样本中 MCM 的含量。

九、96 孔板检测

25. 操作同上，只是各成份的用量需要×25%；在上步计算时，所用光径也非 1 cm，具体多少需要询问 96 孔板厂家。

关联产品	辅酶 B 磺乙基硫转移酶活性测定试剂盒