

蛋白酶活性检测试剂盒(荧光法)

产品编号	产品名称	包装
P0403S	蛋白酶活性检测试剂盒(荧光法)	100次
P0403M	蛋白酶活性检测试剂盒(荧光法)	500次

产品简介:

- 碧云天研发的蛋白酶活性检测试剂盒(荧光法), 即Fluorometric Protease Activity Assay Kit, 简称Protease Assay Kit, 是一种以FITC标记的酪蛋白(FITC-casein)为底物, 快速、高灵敏地对细胞和组织裂解液、细胞培养液上清、血液、纯化的蛋白酶等生物样品中的蛋白酶活性进行检测的试剂盒。
- 蛋白酶(Protease or Proteinase)是广泛存在于各种生物体内水解蛋白质肽链的一类酶的总称, 主要是通过水解氨基酸多肽链的肽键, 起到分解蛋白质的作用。蛋白酶在体内参与众多的生理反应, 发挥着重要的生理作用[1]。例如将蛋白质水解为小分子多肽和氨基酸, 参与食物中蛋白质消化吸收的过程; 使蛋白质失活或激活蛋白质, 参与信号转导调节的过程等。蛋白质水解系统的改变是多种病理状况的基础, 如癌症、神经退行性疾病、炎症和心血管疾病。因此, 很多蛋白酶是医药界关注的焦点[2]。在生物实验中, 细胞或组织提取物等样品中也含有许多内源性的蛋白酶, 容易导致提取物中的蛋白降解, 从而影响后续的蛋白检测。此外, 生物样品或生物试剂中是否有蛋白酶残留也是非常重要的关注点。
- 本试剂盒检测蛋白酶活性的原理如图1所示。酪蛋白标记FITC (Fluorescein isothiocyanate)后, 完整的FITC标记的酪蛋白由于荧光共振能量转移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)导致FITC的荧光被淬灭, 此时荧光信号很弱; 当底物酪蛋白经蛋白酶催化水解, 荧光淬灭效果被破坏并产生FITC所标记的短肽, 荧光信号增强, 通过测试Ex/Em=485/530nm来检测荧光强度, 荧光强度与蛋白酶的活性呈线性关系, 蛋白酶活性越高, 荧光强度越高。

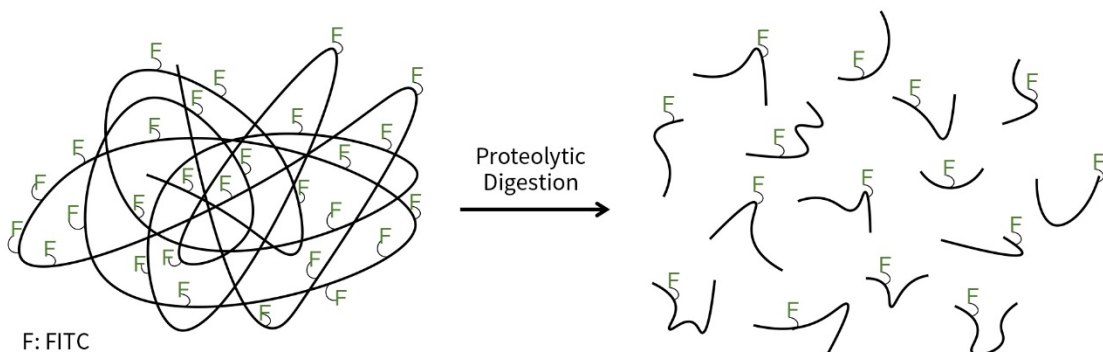


图1. 碧云天蛋白酶活性检测试剂盒(荧光法) (P0403)检测蛋白酶活性的原理图。

- **本试剂盒线性范围宽。**对于Proteinase K的检测, 检测下限约为5ng; 如果延长孵育时间, 检测下限可提高至约1ng, 在1-200ng范围内有良好的线性关系, 换算成本试剂盒的蛋白酶活力单位约为0.3-60μU。本试剂盒提供了FITC标准品, 在0.01-1nmol范围内有良好的线性关系, 可以通过绘制标准曲线(图2A), 计算出样品中蛋白酶的活性。同时本试剂盒也提供了阳性对照Proteinase K(图2B), 便于检测体系的建立。

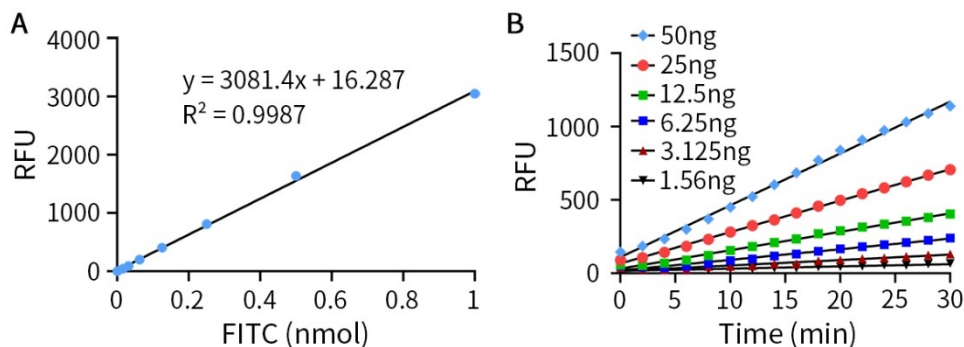


图2. 碧云天蛋白酶活性检测试剂盒(荧光法) (P0403)对于FITC标准品、Proteinase K的检测效果图。图A为本试剂盒对FITC标准品的检测效果图, 在0.01-1nmol范围内有良好的线性关系; 图B为本试剂盒检测不同量阳性对照(Proteinase K)在反应30分钟内的荧光信号变化图。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- **本试剂盒应用范围宽。**本试剂盒以FITC标记的酪蛋白(FITC-labeled casein)为底物定量检测样品中的蛋白酶活性。酪蛋白是一种比较通用的蛋白酶底物，可被多种蛋白酶水解，如胰蛋白酶(Trypsin)、糜蛋白酶(Chymotrypsin)、蛋白酶K (Proteinase K)、嗜热菌蛋白酶(Thermolysin)、链酶蛋白酶(Protease XIV)和弹性蛋白酶(Elastase)等，具有很好的广谱性。
- 按照使用说明操作，用于96孔板进行检测时，本试剂盒小包装可以进行100次检测，中包装可以进行500次检测。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
P0403S-1	Assay Buffer	60ml
P0403S-2	Protease Substrate (5X)	1ml
P0403S-3	FITC Standard (1mM)	50μl
P0403S-4	Proteinase K (2.5mg/ml)	20μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P0403M-1	Assay Buffer	250ml
P0403M-2	Protease Substrate (5X)	5ml
P0403M-3	FITC Standard (1mM)	250μl
P0403M-4	Proteinase K (2.5mg/ml)	100μl
—	说明书	1份

保存条件：

-20℃保存，一年有效。Protease Substrate (5X)和FITC Standard (1mM)须避光保存。

注意事项：

- Assay Buffer、Protease Substrate (5X)需要完全解冻并平衡至室温后再使用，否则会影响检测结果。
- 血清等样品如在4℃保存，保存时间不得超过2周，否则会影响检测结果的准确性。通常血清宜在-20℃保存，-80℃保存更佳。
- Protease Substrate (5X)、Proteinase K (2.5mg/ml)融解后需要适当分装，避免反复冻融。Protease Substrate (5X)反复冻融会使背景增加，检测灵敏度降低。
- 因为酶活力测定方法的不同，蛋白酶有多种活力单位定义，需要注意避免因为蛋白酶活力单位定义的不同而引起误解。
- 检测时建议使用96孔黑板，推荐选购碧云天的BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装) (FCP966)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 样品的制备。

- 血液样品的准备：**对于血清样品，将全血在常温如25℃下放置30分钟至2小时，不要剧烈摇晃以免溶血，待全血自然凝固并析出血清后，4℃约1000-2000×g离心10分钟，取黄色上清即得血清，注意不要吸取白色或淡黄色沉淀；对于血浆样品，将全血用肝素进行抗凝，4℃约1000-2000×g离心10分钟，取黄色或淡黄色上清即得血浆，注意不要吸取白色沉淀。血清和血浆都需置于冰上，如果不能立即检测，也可以分装并短期保存于-20℃或-80℃。对于冻存的样品，在检测前解冻后冰浴存放备用，使用前必须混匀。
- 细胞或组织样品的准备：**对于培养的贴壁细胞，PBS (C0221A)洗涤一次并吸净残留液体。对于培养的悬浮细胞，先适当离心(如100-500×g，5分钟)收集细胞到离心管内，弃上清并吸净残留液体。按照每100万细胞加入100μl-200μl的比例加入Assay Buffer，适当吹打，冰浴5-10分钟以充分裂解细胞。4℃约12,000×g离心3-5分钟，取上清用于后续检测。对于组织样品，按照每10mg组织加入100μl Assay Buffer的比例，使用TissueMaster™高通量组织研磨仪(1.5/2ml×48) (E6618)、TissueMaster™手持式组织研磨仪(E6600/E6607)或玻璃匀浆器在约4℃或冰浴等低温条件下匀浆。将匀浆液在4℃约12,000×g离心3-5分钟，取上清用于后续检测。以上所有操作均需在4℃或冰上操作。制备好的细胞或组织样品如果不能立即检测，可以-20℃或-80℃冻存。
- 细胞培养上清样品的准备：**对于贴壁细胞，直接取培养液；对于悬浮细胞，离心取培养液。

2. 试剂盒的准备。

- 融解Assay Buffer、Protease Substrate (5X)，平衡至室温后混匀备用。其它试剂存放于冰浴备用，使用完毕后宜立即按照试剂盒要求的条件保存。
- Protease Substrate工作液的配制。**按照每个反应50μl的体积配制适量的Protease Substrate工作液。例如200μl Protease Substrate (5X)加入800μl Assay Buffer，混匀，即可配制成1ml Protease Substrate工作液。根据待检测样品的数量，配制适量的Protease Substrate工作液。

3. 样品测定。

- FITC标准曲线的设置。
取5μl FITC (1mM)，加入495μl Assay Buffer，混匀，配制成500μl浓度为10μM的FITC标准溶液。分别取10μM的FITC标

准溶液0、1.56、3.12、6.25、12.5、25、50、100μl加入96孔板的标准品孔中，并用Assay Buffer补足至100μl (或采用倍比稀释的方式配制标准溶液)，此时，标准曲线各孔FITC的浓度和物质的量分别为0、0.16、0.31、0.62、1.25、2.5、5、10μM或0、0.016、0.031、0.062、0.125、0.25、0.5、1nmol。

注：初次检测，可以按照以上浓度设置标准曲线。在后续的实验中，可以根据样品中蛋白酶的活性对标准品的浓度范围进行适当调整。

b. 阳性对照的设置。

取适量的Proteinase K (2.5mg/ml)，用Assay Buffer将其50倍稀释。例如取2μl Proteinase K (2.5mg/ml)，加入98μl的Assay Buffer，颠倒混匀，即为50μg/ml的Proteinase K。再用Assay Buffer将其50倍稀释，例如取2μl Proteinase K (50μg/ml)，加入98μl的Assay Buffer，颠倒混匀，即为1μg/ml的Proteinase K。用于阳性对照时，每孔50μl，即50ng/孔。阳性对照可根据样品中蛋白酶的活性调整稀释倍数。

c. 取1-50μl样品或稀释后的样品至96孔板样品孔中，并相应地加入Assay Buffer补足至50μl。同时设置仅含Assay Buffer的孔为空白对照孔。

注：为确保数值在标准曲线范围内，建议样品同时设定多个稀释倍数，可以进行预实验确定样品的大致浓度，如果数值不在标准曲线范围内，可调整样品的稀释倍数或者增加样品的量。样品总稀释倍数记为n (例如本步骤中对样品进行了5倍稀释，加入的‘稀释后的样品’为10μl，则 $n=5 \times 50/10=25$)。

d. 除FITC标准曲线外的其余各孔中加入Protease Substrate工作液50μl，混匀。

e. 立即使用适当的酶标仪，激发波长设为485nm、发射波长设为530nm进行荧光检测。此时记录初始读值为F1。

f. 37°C反应10-30分钟，反应时间记录为T，通常每2分钟或5分钟测定一次荧光值，第n次的荧光读数记为Fn。荧光的增强取决于蛋白酶水解底物后生成的FITC的量， $\Delta F = F_n - F_1$ 。

注：为取得最佳的检测结果，反应时间可以根据待测样品中的蛋白酶活性进行调整，但必须确保读数在标准曲线的线性范围之内。对于蛋白酶活性较高的样品，建议测定总时间为20或30分钟，对应的测定间隔时间设为2分钟或5分钟。对于蛋白酶活性较低的样品，可以延长测定总时长为1小时，对应的测定间隔时间设为10或20分钟；也可以连续测定30分钟，每隔1或2分钟测定一次。最后取反应开始后呈线性的时间点范围内的数据用于分析或计算。

g. 建立FITC标准曲线，将 ΔF 代入标准曲线，即可计算出反应时间内样品中蛋白酶催化产生的FITC的量(记为Sa)。FITC标准曲线可以参考图2A，在0.01-1nmol范围内有良好的线性关系。蛋白酶活性计算公式如下：

$$\text{Protease Activity (mU/ml)} = \text{Sa} \times n / (T \times V_{\text{sample}} (\text{ml}))$$

注：Sa为步骤3g根据标准曲线确定的FITC的生成量(nmol)；

n为步骤3c样品总稀释倍数；

T为步骤3f的反应时间(min)；

V_{sample} (ml)为反应体系中样品的体积，本反应体系中样品的体积为0.05ml。

蛋白酶的活力定义：在适宜的温度、pH和反应体系中，在底物FITC标记的酪蛋白较为充裕的情况下，1分钟内可以催化生成1μmol FITC的蛋白酶的量，定义为一个蛋白酶活力单位(Unit, U)。

注：文献中蛋白酶的酶活性定义可能会因为酶活力测定方法的不同而有较大的区别。

计算示例：

FITC生成量(Sa)=0.318nmol；

样品总稀释倍数(n)=25；

反应时间(T)=30min；

Protease Activity=0.318×25/(30×0.05)=5.3nmol/min/ml，或5.3mU/ml。

4. 补充说明。

a. 低浓度的蔗糖(20mM)、EDTA (50μM)、DTT (20μM)、NAD (20μM)、Triton X-100 (0.1%)、NaCl (20mM)对本试剂盒没有干扰。高浓度的蔗糖(200mM)、EDTA (10mM)、DTT (10mM)、NAD (2mM)、Triton X-100 (1%)、NaCl (2M)会影响检测灵敏度。

b. 本试剂盒提供的Assay Buffer的pH为7.5，该pH值可以满足反应pH值在7.4-7.8之间的酶，如胰酶、糜蛋白酶、蛋白酶K、嗜热菌蛋白酶等。还有一些蛋白酶反应的最适pH值不在该范围内，建议参考文献更换合适的Assay Buffer。常见的一些蛋白酶反应缓冲液请参考下表。

Protease	Assay Buffer
Cathepsin B	20mM sodium acetate, 5mM cysteine, 1mM EDTA, pH5.0
Cathepsin D	20mM sodium citrate, pH3.0
Papain	20mM sodium acetate, 20mM cysteine, 2mM EDTA, pH6.5
PAE	20mM sodium phosphate, pH8.0
Pepsin	10mM HCl, pH2.0
Porcine pancreas elastase	10mM Tris-HCl, pH8.8
Subtilisin	20mM potassium phosphate buffer, 150mM NaCl, pH7.6

注：如果使用自行配制的裂解液或Assay buffer，请用阳性对照测试加入该裂解液或Assay buffer后酶活是否不受影响。本表仅供参考。

参考文献：

1. Britannica. Encyclopedia Britannica. 2023.
2. López-Otín C, Bond JS. J Biol Chem. 2008. 283(45):30433-7.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
P0324	胰蛋白酶活性检测试剂盒(显色法)	100次/500次
P0325	胰蛋白酶活性检测试剂盒(荧光法)	100次/500次
P0338	基质金属蛋白酶3 (MMP-3)活性荧光检测试剂盒	100次/500次
P0403	蛋白酶活性检测试剂盒(荧光法)	100次/500次

Version 2025.01.17