

## Phosphate Sensor Assay Kit (磷酸根荧光检测试剂盒)

产品编号	产品名称	包装
S0192S	Phosphate Sensor Assay Kit (磷酸根荧光检测试剂盒)	200次
S0192M	Phosphate Sensor Assay Kit (磷酸根荧光检测试剂盒)	1000次

### 产品简介:

- 碧云天生产的Phosphate Sensor Assay Kit (磷酸根荧光检测试剂盒), 也称磷酸根传感器检测试剂盒或Phosphate Fluorescent Assay Kit, 是一种采用荧光基团标记的重组磷酸根结合蛋白, 从而可以超高灵敏度检测溶液中的无机磷酸根或ATP酶(ATPase)、GTP酶(GTPase), 磷酸酶(phosphatase)和磷酸二酯酶(phosphodiesterase)等酶活性的荧光检测试剂盒。
- 本产品对于无机磷酸根( $\text{PO}_4^{3-}$ )的检测灵敏度可以低至100nM。不仅适用于直接检测无机磷酸根的浓度, 也被广泛用于检测能够直接或间接催化产生无机磷酸根的ATPase, GTPase, phosphatase和phosphodiesterase等酶的活性。
- Phosphate Sensor是大肠杆菌(*E.coli*)磷酸根结合蛋白(phosphate-binding protein) A197C突变体重组蛋白用环境敏感型荧光基团MDCC (N-[2-(1-Maleimidyl)ethyl]-7-(diethylamino)coumarin-3-carboxamide)进行化学标记的产物。该无机磷酸根荧光探针(phosphate fluorescent probe)对无机磷酸根高度敏感, 能和无机磷酸根快速并紧密( $K_d \sim 0.1 \mu\text{M}$ )结合。无机磷酸根的结合会引起该传感器蛋白发生明显的构象变化, 并导致荧光强度的明显增强。因此该荧光探针可以用于快速、超高灵敏度对溶液中的无机磷酸根进行实时动力学检测。
- Phosphate Sensor与无机磷酸根结合后荧光信号显著增强。激发光波长为430nm, 发射光波长为450nm的条件下, Phosphate Sensor与无机磷酸根结合后荧光信号增强最为显著, 荧光信号升高约9倍(图1)。

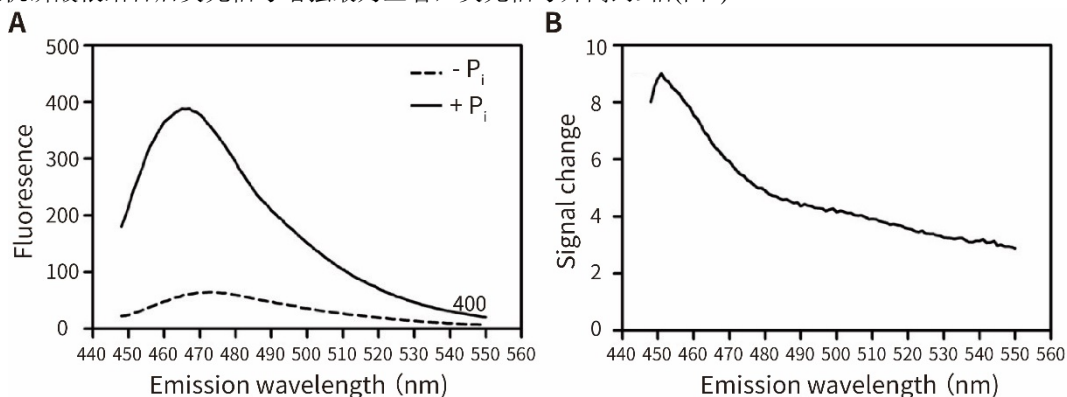


图1. Phosphate Sensor Assay Kit (磷酸根荧光检测试剂盒)中Phosphate Sensor结合无机磷酸根前后的荧光信号差异。检测体系(20 $\mu\text{l}$ ): 5 $\mu\text{M}$  Phosphate Sensor, 0或1mM Phosphate Standard, 1X检测缓冲液。依次将10 $\mu\text{l}$  0或2mM Phosphate Standard和10 $\mu\text{l}$  10 $\mu\text{M}$  Phosphate Sensor加入384孔黑板(具体浓度的Phosphate Standard和Phosphate Sensor均由本试剂盒提供的试剂经1X检测缓冲液稀释获得)。采用荧光酶标仪在25 $^{\circ}\text{C}$  430nm激发光条件下进行不同发射光波长的荧光测定, 每组实验体系重复三次并取平均值。当反应体系中不加入无机磷酸根时, Phosphate Sensor在430nm激发光条件下的最大发射波长约为474nm; 当反应体系中加入无机磷酸根时, Phosphate Sensor在430nm激发光条件下的最大发射波长约为465nm (图1A)。当激发光/发射光分别为430nm/450nm时, Phosphate Sensor在无机磷酸根结合前后的荧光信号差异最显著(图1B)。

- 本产品检测无机磷酸根的敏感范围约在100nM-5 $\mu\text{M}$ 之间(图2), 比传统的孔雀绿磷酸根检测法(Malachite green phosphate assay)敏感约100倍以上。
- Phosphate Sensor对溶液中浓度低至100nM的无机磷酸根的结合即可导致明显的荧光增强, 实测的 $\text{EC}_{50}$ 约为1.7 $\mu\text{M}$  (图2), 不同检测条件的检测数据会略有差异。

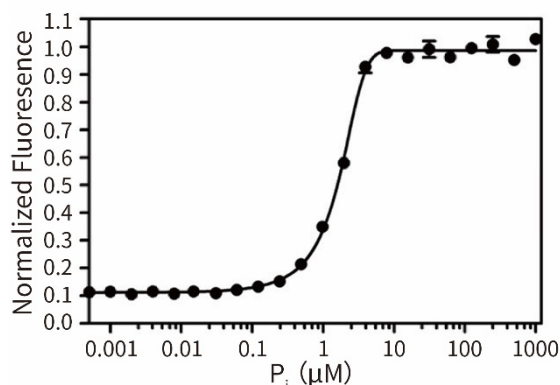


图2. Phosphate Sensor Assay Kit (磷酸根荧光检测试剂盒)中Phosphate Sensor结合无机磷酸根的标准曲线。检测体系(20μl): 5μM Phosphate Sensor, 1X检测缓冲液, 0-1mM Phosphate Standard。依次将10μl 0-2mM Phosphate Standard和10μl 10μM Phosphate Sensor加入384孔黑板(具体浓度的Phosphate Standard和Phosphate Sensor均由本试剂盒提供的试剂经1X检测缓冲液稀释获得)。采用荧光酶标仪在25℃激发光/发射光波长分别为430nm/450nm条件下进行荧光测定, 每组实验体系重复三次。利用GraphPad Prism软件中的“variable slope”模型 $[Y=Bottom+Top-Bottom)/(1+10^{-(LogEC50-X)*HillSlope})]$ 拟合出标准曲线。不同实验条件的检测数据会略有差异, 图中数据仅供参考。

- **用途:** 无机磷酸根浓度的超灵敏度荧光检测, ATP酶(ATPase)、GTP酶(GTPase)、磷酸酶(Phosphatase)和磷酸二酯酶(Phosphodiesterase)等可以直接或间接催化产生无机磷酸根的酶的高灵敏度活性检测。
- **Phosphate Sensor来源:** MDCC荧光标记的*E.coli*表达的重组蛋白, 表达基因为*E.coli phoS*基因A197C突变体。
- 本产品检测过程中操作简单, 使用方便, 通常10-30个样品可以在30-60分钟内测定完毕。
- 一个小包装或中包装的本产品, 其中分别含有20nmol或100nmol的Phosphate Sensor, 如果用于20μl检测体系, 通常分别可以进行200或1000次检测。

**包装清单:**

产品编号	产品名称	包装
S0192S-1	Phosphate Sensor (100μM)	200μl
S0192S-2	10X检测缓冲液	2ml
S0192S-3	Phosphate Standard (10mM)	0.2ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
S0192M-1	Phosphate Sensor (100μM)	1ml
S0192M-2	10X检测缓冲液	10ml
S0192M-3	Phosphate Standard (10mM)	1ml
—	说明书	1份

**保存条件:**

-20℃避光保存, 至少一年有效。

**注意事项:**

- 由于Phosphate Sensor储存液中含有高浓度甘油, 为减小操作误差, 建议根据每次实验所需的量预先用1X检测缓冲液将一定量的Phosphate Sensor稀释成10μM或其它合适浓度备用。
- 请注意不同批次Phosphate Sensor浓度可能会有不同, 使用时以收到产品的说明书和产品标签上的浓度为准。
- 使用荧光酶标仪检测时, 为避免相邻孔之间的荧光信号干扰, 推荐使用孔和孔之间不透光的384孔黑板。
- 某些表面有涂层的多孔板可能含有无机磷酸根, 容易干扰检测体系。因此, 建议使用表面未加涂层的384孔黑板进行检测。
- 由于不同荧光检测设备的灵敏度有所差异, 实际检测过程中可以根据荧光信号的强弱适当调整检测体系中Phosphate Sensor的终浓度。
- 检测体系中须注意避免引入气泡, 可以在检测之前对检测板进行离心或震荡处理。
- 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. 样品中无机磷酸根浓度的精确测定:**

a. 试剂的准备。

根据样品和标准品的数量, 溶解10X检测缓冲液, 用水配制适量的1X检测缓冲液。按照每个样品或标准品需要5μl 10μM Phosphate Sensor量, 用1X检测缓冲液配制适量的10μM Phosphate Sensor。1X检测缓冲液配制后可以冻存并用于后续使用,

10 $\mu$ M Phosphate Sensor配制后宜4 $^{\circ}$ C或冰浴保存,并在当日使用,不宜冻存并用于后续使用。Phosphate Sensor的最佳浓度可根据实际检测效果进行适当调整。

b. 标准品的准备。

取适量Phosphate Standard (10mM),用1X检测缓冲液稀释成不同浓度的标准品,例如2mM、1mM、0.5mM、0.25mM、0.125mM、62.5 $\mu$ M、31.3 $\mu$ M、15.6 $\mu$ M、7.8 $\mu$ M.....3.9 $\mu$ M、1.95 $\mu$ M、0 $\mu$ M。标准品的浓度范围和浓度点可以根据实际检测效果适当调整。

c. 样品的准备。

对于待检测的样品,根据预测的样品中的无机磷酸根的浓度,用1X检测缓冲液将样品稀释至无机磷酸根的浓度约在200nM-2 $\mu$ M范围,每个样品的体积不少于10 $\mu$ l。

d. 标准品和样品的检测。

(a) 参考下表设置反应体系。使用384孔黑板,先加入10 $\mu$ l 10 $\mu$ M Phosphate Sensor,再加入10 $\mu$ l不同浓度的上述Phosphate Standard溶液或待检测的样品,充分混匀后进行荧光测定。检测条件为25 $^{\circ}$ C,激发光/发射光=430nm/450nm。为减小误差,每组实验体系最好能重复三次。

Reagent	Standard	Sample
Phosphate Sensor (10 $\mu$ M)	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Phosphate Standard	10 $\mu$ l	0 $\mu$ l
待测样品	0 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Total Volume	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l

(b) 利用GraphPad Prism软件中的“variable slope”模型 $[Y=Bottom+(Top-Bottom)/(1+10^{-(\log(X)-EC50)/HillSlope})]$ 拟合出标准曲线,拟合之前需先将Phosphate浓度“X”转换成“log(X)”。根据标准曲线计算出样品中的无机磷酸根的浓度。

## 2. 样品中催化生成无机磷酸根的酶活性检测。

a. 终点法酶活性检测。

(a) 参考文献资料,针对具体的酶,例如ATPase, GTPase, Phosphatase和phosphodiesterase等设置相应的酶反应体系。

(b) 反应结束后,参考上述步骤1c,用1X检测缓冲液稀释样品至无机磷酸根浓度约在200nM-2 $\mu$ M范围,每个样品的体积不少于10 $\mu$ l。

(c) 同上述步骤1,设置标准曲线,并进行标准品和样品的检测。

(d) 根据样品和对照中检测出的无机磷酸根的浓度,和相应的酶活性定义,计算出样品中的酶活性。如果有必要可以检测样品的蛋白浓度,以计算出单位蛋白含量样品中的酶活性。

b. 酶活性的动力学检测。

(a) 参考文献资料,针对具体的酶,例如ATPase, GTPase, Phosphatase和phosphodiesterase等规划相应的酶反应体系。推荐反应体系的最终体积为20 $\mu$ l,并在384孔黑板中进行反应。

(b) 在酶反应体系中加入Phosphate Sensor至终浓度为5 $\mu$ M。

(c) 加入ATPase等酶的关键底物起始酶反应。

(d) 每间隔适当时间进行荧光检测,激发光/发射光=430nm/450nm。

(e) 根据样品和对照在不同时间点的荧光读数,以及参考步骤1进行的标准曲线检测结果,计算出在单位时间内样品中酶催化产生的无机磷酸根的量。然后再根据酶的活性定义,计算出样品中酶活性。如果有必要可以检测样品的蛋白浓度,以计算出单位蛋白含量样品中的酶活性。

Version 2022.05.11