鸟苷三磷酸酶（GTPase）检测试剂盒（微量法）

货　　号：PMK1960BKM
规　　格：48T/24S 96T/48S
检测方法：比色法
储存条件：-20℃避光保存 12 个月

建议正式实验前，选取 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验，如果样本吸光值不在检测范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

一、产品简介

研究背景：

GTPase（鸟苷三磷酸酶）广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，是一类能够特异性结合并水解鸟苷三磷酸（GTP）生成鸟苷二磷酸（GDP）和无机磷酸（Pi）的酶类，广泛参与细胞信号转导、细胞增殖、蛋白质合成、囊泡运输及细胞骨架调控等关键生物学过程。在 Mg2+存在的条件下，GTPase 可催化 GTP 水解反应。

检测原理：本试剂盒提供了一种简单易用的比色法，用于分析各种生物样品中 GTPase 的活性。其原理是 GTP 酶水解 GTP 产生 GDP 和 Pi，通过定磷法测定 Pi 增加速率来测定 GTPase 活性。

检测意义：酶学与动力学研究、靶向药物筛选、信号通路解析。

适用样本：动植物组织、细胞、细菌、血清、血浆、培养液等液体样本。

二、产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液一	50mL	100mL	4℃保存
提取液二	1mL	2mL	4℃避光保存
反应缓冲液	4mL	8mL	4℃保存
试剂一	0.5mL	1mL	-20℃保存
试剂二	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	4℃避光保存
试剂四	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	4℃避光保存
试剂五	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	4℃避光保存
试剂六	5mL	10mL	室温保存
标准品（10mM 标准磷贮备液）	1mL	1mL	4℃保存

三、需自备的仪器和用品

酶标仪或可见光分光光度计（能测 660nm 处的吸光度）及恒温箱/水浴锅、96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头、离心机、制冰机、去离子水、匀浆器。（如果是组织样本）

四、试剂准备

提取液一：临用前，按 1mL 提取液一加入 1μL 试剂一的比例加入试剂一；现用现加。4℃保存。

提取液二：即用型；使用前，平衡到室温；4℃避光保存。

反应缓冲液：临用前，平衡到室温，按 1mL 反应缓冲液加入 1μL 试剂一的比例加入试剂一；现用现加。

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；分装-20℃避光保存。

试剂二：临用前每支加入 1mL 去离子水充分溶解备用；用不完的试剂分装-20℃保存。

试剂三：临用前配制，每瓶加入 2mL 去离子水充分溶解后使用；4℃避光保存。

试剂四：临用前配制，每瓶加入 5mL 去离子水充分溶解后使用；4℃避光保存 2-3 天或分装后-20℃避光保存，避免反复冻融。

试剂五：临用前配制，每瓶加入 5mL 去离子水充分溶解后使用；4℃避光保存。

试剂六：即用型；室温保存。

定磷试剂的配制：配制比例按照 H_2O：试剂四: 试剂五 ：试剂六=2:1:1:1 的比例配制，配好的定磷试剂应为浅黄色。若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染（请根据需要，用多少配多少）。

注意：配试剂最好用新的玻璃器皿或者一次性塑料器皿，以避免磷污染。

标准曲线设置：按下表所示用去离子水将 10mM 标准品稀释为 1000、500、250、125、62.5、31.3、15.6 mM 的标准溶液。

	标准品体积（μL）	去离子水体积（μL）	标准品浓度（μM）
标准品 1	100μL 10mM	900	1000
标准品 2	100μL of 标准品 1	100	500
标准品 3	100μL of 标准品 2	100	250
标准品 4	100μL of 标准品 3	100	125
标准品 5	100μL of 标准品 4	100	62.5
标准品 6	100μL of 标准品 5	100	31.25
标准品 7	100μL of 标准品 6	100	15.6

⚠ **注意：每次实验，请使用新配制的标准品。**

五、样本制备

动植物组织：称取约 0.1g 样本，加入 990μL 加入试剂一的提取液一和 10μL 提取液二冰浴匀浆，12,000g，4℃离心 10min，取上清液置冰上待测。

细胞或细菌：收集 500 万细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 990μL 加入试剂一的提取液一和 10μL 提取液二，超声波破碎细胞或细菌 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），12,000g，4℃离心 10min，取上清液置冰上待测。

血清（浆）或培养液等液体样本：直接测定，根据预实验确定稀释倍数，若较浑浊，可先离心。

⚠ **注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。 如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。**

六、实验步骤

1. 酶标仪或可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 660nm，可见分光光度计去离子水调零。
2. 酶促反应（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

	空白管（μL）	标准管（μL）	测定管（μL）	对照管（μL）
试剂二	0	0	10	10
反应缓冲液	0	0	40	40
样本	0	0	50	0
混匀后盖紧，37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）准确孵育 30min				
试剂三	0	0	20	20
样本	0	0	0	50
混匀后，室温（25℃左右），4,000g，离心 10min，取上清液；				
1. 定磷(在 96 孔板或微量玻璃比色皿中加入下列试剂）				
上清	0	0	40	40
不同浓度标准品	0	40	0	0
去离子水	40	0	0	0
定磷试剂	200	200	200	200

混匀，室温静置 10min 后，测定 660nm 吸光值。计算$\Delta A_{测}=A_{测定}-A_{对照}$，$\Delta A_{标}=A_{标准}-A_{空白}$。（每个测定管需设一个对照，空白和标准曲线只需要测一次）

⚠ **注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果$\Delta A_{测}$小于 0.001 可适当加大样本量。如果$\Delta A_{测}$大于 1.5，样本可用提取液一进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数。**

七、结果计算

1. 标准曲线的绘制：

以标准品浓度为 y 轴，$\Delta A_{标准}$为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。将$\Delta A_{测}$带入方程计算出 y 值（μM=nmol/mL）。

2. 样本 GTPase 活性计算

（1）按样本质量计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活性单位 U。

GTPase 活性(U/g 质量) = $(y\times V_{反总})\div(W\times V_{样}\div V_{样总})\div T\times n=0.067\times y\div W\times n$

（2）按液体样本体积计算

单位的定义：每 mL 液体样本在反应体系中每分钟产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活性单位 U。

GTPase 活性(U/mL) = $(y\times V_{反总})\div V_{样}\div T\times n=0.067\times y\times n$

（3）按细菌或细胞数量计算

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活力单位 U。

GTPase 活性$(U/10^4\ cell)= (y\times V_{反总})\div$细胞数量$\times V_{样}\div V_{样总})\div T\times n=0.067\times y\div$细胞数量$\times n$

（4）按蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活力单位 U。

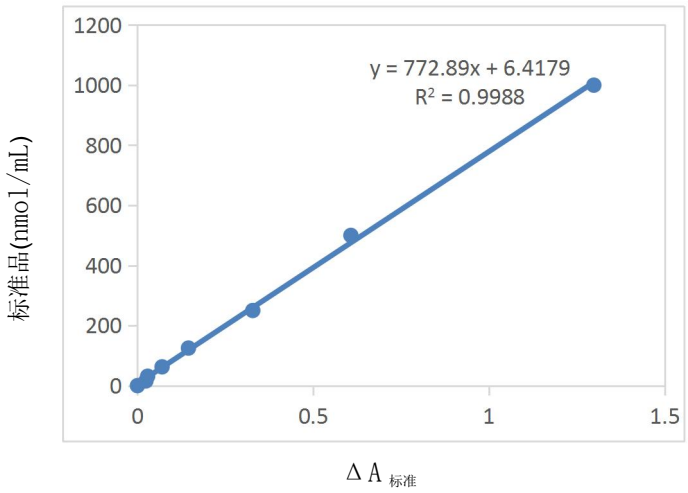
GTPase 活性（U/mg prot）=$(y\times V_{反总})\div(Cpr\times V_{样})\div T\times n=0.067\times y\div Cpr\times n$

$V_{反总}$：反应体系总体积，0.1mL；W：样本质量，g；$V_{样}$：加入样本体积，0.05mL；$V_{样总}$：加入提

取液体积，1mL；T：反应时间，30min；细胞数量：细胞或细菌总数，以万为单位；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；n：样本进一步稀释的稀释倍数。

结果展示

典型标准曲线



附录：常见问题与解决方案（FAQ）

问题	解决措施
计算时如果选择合适的计算公式？	动物组织及细胞微生物等，可以用质量或者细胞数量计算，也可以建议测蛋白浓度
	植物可建议用质量计算，也可以建议测蛋白
	血液或是其他液态样品，可建议用体积计算
	如客户要购买蛋白含量测定试剂盒，除了说明书强调用考马斯亮蓝法的，通常建议 BCA 法。动植物组织因为蛋白含量高，在 10mg/ml 左右，如果用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度的话通常需要用 PBS 缓冲液等稀释液进行稀释。
测定时如何进行调零？	除说明书中提示用对照管或某种试剂调零外，都用纯水调零。
试剂盒中样本提取时需要 0.1g 组织，我的样品量不够怎么办？	通常可以按比例缩小，如说明书中是约 0.1g 组织加 1ml 提取液，可以等比例缩小，如 0.05g 组织加 0.5ml 提取液提取。后续操作不变。
	对于数量少的样品，一方面可以减少提取液体积，另一方面还可以延长反应时间。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。

2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。

3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1012 NADP 磷酸酶（NADPase）检测试剂盒（微量法）

PMK1234 葡萄糖-6-磷酸酶（G6P)检测试剂盒（NADH 速率法/微量法）

PMK1892 果糖-1,6-二磷酸酶(FBP)/果糖-1,6-二磷酸酯酶检测试剂盒（定磷法/微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：