

真菌/酵母细胞 β 1, 3- D-葡聚糖合成酶活性定量检测试剂盒产品说明书 (中文版)

主要用途

真菌/酵母细胞 β 1, 3- D-葡聚糖合成酶活性定量检测试剂是一种旨在通过 β 1, 3- D-葡聚糖合成酶反应系统中尿嘧啶核苷-5'-二磷酸葡萄糖底物聚合成葡聚糖, 与荧光染料结合产生荧光峰值的变化, 来测定样品中酶活性的权威而经典的技术方法。该技术由大师级科学家精心研制、成功实验证明的。其适用于各种真菌或酵母细胞裂解悬液中 β 1, 3- D-葡聚糖合成酶的活性检测。产品严格无菌, 即到即用, 操作简捷, 性能稳定, 具有高通量特点。

技术背景

真菌/酵母细胞壁结构具有丰富的糖蛋白外层和碳水化合物内层, 包括 (1,3) - β -D, (1,6) - β -D和 (1,3) - α -D-葡聚糖 (glucan)。其中 (1,3) - β -D为主要元素。1,3- β -D-葡聚糖合成酶 (1,3- β -D-glucan synthase; GS; EC.2.4.1.34), 又称为尿嘧啶核苷-5'-二磷酸葡萄糖: 1,3- β -葡萄糖基转移酶 (UDP-glucose: 1,3- β -glucosyl transferase), 催化以尿嘧啶核苷-5'-二磷酸葡萄糖 (UDP-glucose) 为底物, 通过1,3- β 链接聚合为葡聚糖的反应, 构成真菌/酵母细胞壁结构中主要碳水化合物成分1,3- β -D-葡聚糖, 为细胞生长所必需。1,3- β -D-葡聚糖合成酶具有两种结构体: 1个调节亚体, GTPase Rho1p和4个催化亚体, Bgs1p-4p或Fksp。(1,3) - β -D-葡聚糖合成酶成为抗真菌药物, 例如卡泊芬净 (caspofungin) 等的靶标。基于底物UDP-glucose在葡聚糖合成酶的催化下, 聚合成 (1,3) - β -D-葡聚糖产物, 与苯胺蓝 (Aniline blue; 4,4'- (carbonyl-bis (benzene-4,1-diyl) -bis- (imino) -bis-benzenesulfonic acid) 反应产生复合物, 呈现荧光峰值的变化 (激发波长400nm, 散发波长460nm), 由此定量测定 β 1, 3- D-葡聚糖合成酶的活性。

产品内容

裂解液 (Reagent A)	毫升
强化液 (Reagent B)	毫升
缓冲液 (Reagent C)	毫升
底物液 (Reagent D)	微升
终止液 (Reagent E)	微升
反应液 (Reagent F)	毫升
稀释液 (Reagent G)	微升
标准液 (Reagent H)	微升
产品说明书	1 份

保存方式

保存在-20℃冰箱里; 反应液 (Reagent F) 避免光照; 终止液 (Reagent E) 具有腐蚀性, 注意操作安全; 有效保证 6 月

用户自备

- 15 毫升锥形离心管：用于真菌/酵母细胞收集的容器
- 1.5 毫升离心管：用于真菌/酵母细胞裂解操作或反应液配制的容器
- 台式离心机：用于沉淀真菌/酵母细胞
- 微型台式离心机：用于真菌/酵母细胞裂解悬液澄清
- 超速离心机：用于微粒体样品制备
- 恒温培养箱或恒温水槽：用于反应孵育
- 比色皿或酶标板：用于染色后荧光检测的容器
- 荧光分光光度仪或荧光酶标仪：用于荧光分析

实验步骤

一、样品准备

1. 准备好 10 毫升待测的新鲜真菌/酵母细胞 ($OD_{600}=0.4$ 至 0.8 , 即 1 至 2×10^7 细胞/毫升)
2. 移入到预冷的 15 毫升锥形离心管
3. 置于冰槽里 5 分钟
4. 放进 4°C 台式离心机离心 10 分钟, 速度为 $3000g$
5. 小心抽去上清液
6. 加入 xx 微升 **裂解液 (Reagent A)**, 充分混匀
7. 转移到预冷的 1.5 毫升离心管
8. 加入 xx 微升 **强化液 (Reagent B)** (注意: 参见注意事项 3)
9. 强力涡旋震荡 15 秒
10. 置于冰槽里 1 分钟
11. 重复实验步骤 9 至 10 五次
12. 加入 xx 微升 **裂解液 (Reagent A)**, 充分混匀
13. 放进 4°C 微型台式离心机离心 10 分钟, 速度为 $1000g$ (或 3500RPM , 例如 eppendorf 5415)
14. 小心移取 500 微升上清液到新的预冷的 1.5 毫升离心管
15. (选择步骤) 如果使用微粒体样品, 放进 4°C 超速离心机离心 60 分钟, 速度为 $100000g$
16. (选择步骤) 小心移取 500 微升上清液到新的预冷的 1.5 毫升离心管
17. 移取 5 微升进行蛋白定量测定 (注意: 建议使用 *Bradford* 蛋白质浓度定量试剂盒—
30030.1)
18. 即刻放进 -70°C 保存或置于冰槽里继续后续操作

二、测定准备

1. 准备好待测样品 (例如细胞裂解萃取液或微粒体样品等), 置于冰槽里
2. 设定好荧光分光光度仪或荧光酶标仪 (温度为 25°C): 激发波长 400nm , 散发波长 460nm , 并置零
3. 准备好 5 个 1.5 毫升离心管, 标记为 1 至 5 号管
4. 分别加入 xx 微升 **稀释液 (Reagent G)** 到 2 至 5 号管
5. 移取 xx 微升 **标准液 (Reagent H)** 到 1 号管, 混匀
6. 小心移取 xx 微升 1 号管稀释的 **标准液 (Reagent H)** 到 2 号管, 混匀
7. 小心移取 xx 微升 2 号管稀释的 **标准液 (Reagent H)** 到 3 号管, 混匀

8. 小心移取 20 微升 3 号管稀释的 **标准液 (Reagent H)** 到 4 号管, 混匀
9. 将 1 至 5 号管置于室温下备用; 标准管浓度见下表

管号	稀释液 (Reagent G)	标准液 (Reagent H)	标准葡聚糖浓度
1	—	微升	纳摩尔/升
2	微升	微升 1 号管	纳摩尔/升
3	微升	微升 2 号管	纳摩尔/升
4	微升	微升 3 号管	纳摩尔/升
5	微升	0	0

三、标准曲线测定

1. 移取 xx 微升 **缓冲液 (Reagent C)** 到 1.5 毫升离心管
2. 加入 5 微升上述配制的标准液
3. 加入 xx 微升 **终止液 (Reagent E)**
4. 放进 80°C 恒温培养箱或恒温水槽孵育 30 分钟, 避免干枯
5. 加入 xx 微升 **反应液 (Reagent F)**, 混匀
6. 放进 50°C 恒温培养箱或恒温水槽孵育 30 分钟, 避免光照
7. 室温下孵育 30 分钟, 避免光照
8. 转移到比色皿或酶标板
9. 即刻放进荧光分光光度仪检测: 获得相对荧光读数
10. 重复实验步骤 1 至 9 四次
11. 构建标准曲线: 纵座标 (Y 轴) 为相对荧光单位; 横座标 (X 轴) 为标准葡聚糖浓度 (纳摩尔/升)

四、样品测定

1. 移取 xx 微升 **缓冲液 (Reagent C)** 到 1.5 毫升离心管
2. 加入 xx 微升 **底物液 (Reagent D)**
3. 加入 xx 微升上述制备的待测样品 (20 微克微粒体蛋白或 100 微克细胞裂解萃取液蛋白), 混匀 (注意: 样品须清澈)
4. 室温下 (25°C) 孵育 30 分钟
5. 加入 xx 微升 **终止液 (Reagent E)**
6. 放进 80°C 恒温培养箱或恒温水槽孵育 30 分钟, 避免干枯
7. 加入 xx 微升 **反应液 (Reagent F)**, 混匀
8. 放进 50°C 恒温培养箱或恒温水槽孵育 30 分钟, 避免光照
9. 室温下孵育 30 分钟, 避免光照
10. 转移到比色皿或酶标板
11. 即刻放进荧光分光光度仪检测: 获得样品相对荧光读数
12. 根据标准曲线获得样品对应葡聚糖浓度

五、计算样品活性

[根据标准曲线获得样品对应葡聚糖浓度 (纳摩尔/升) X 样品稀释倍数] ÷ X xx (分钟) = 皮摩尔/毫升/分钟 ÷ (样品蛋白浓度) 毫克/毫升 = 皮摩尔/毫克/分钟

注意事项

1. 本产品为 25 次操作，包括标准样
2. 操作时，须戴手套
3. **强化液 (Reagent B)** 为固体状，移取方法为：使用 1 毫升枪头，将尖端部分剪去；或使用 0.5 毫升 PCR 管的盖子内圈盛满；或称重 0.1 克
4. **终止液 (Reagent E)** 具有腐蚀性，注意操作安全
5. 建议测定细胞裂解悬液的蛋白浓度，便于计算活性单位之需；建议使用一 Bradford 蛋白质浓度定量检测试剂盒 (30030.1)
6. 荧光测定后，比色皿须清洗彻底
7. 酶活性单位浓度定义：在 28℃ 室温下，pH 7.8 的情况下，每单位酶在单位时间内（每分钟）合成 1 微摩尔的葡聚糖
8. 待测样本为微粒体，其蛋白浓度为 20 微克/5 微升；待测样本为细胞裂解悬液，其蛋白浓度为 100 至 200 微克/5 微升（本公司提供 GENMED Bradford 蛋白质浓度定量试剂盒 30030.1)
9. 如果待测样品浓度过高或过低，可以调整样品浓度
10. 本公司提供系列真菌/酵母细胞酶学相关试剂产品

质量标准

1. 本产品经鉴定性能稳定
2. 本产品经鉴定检测敏感