

尿激酶活性检测试剂盒(荧光法)

产品编号	产品名称	包装
P0389S	尿激酶活性检测试剂盒(荧光法)	100次
P0389M	尿激酶活性检测试剂盒(荧光法)	500次

产品简介:

- 碧云天研发的尿激酶活性检测试剂盒(荧光法) (Urokinase Activity Assay Kit, Fluorometric), 又称uPA Activity Assay Kit、u-Plasminogen Activator Activity Assay Kit或PLAU Activity Assay Kit, 是一种基于尿激酶催化底物生成荧光物质AMC, 通过荧光法, 快速、灵敏地检测细胞、血液等样品中尿激酶活性的试剂盒。
- 人体内最重要的两个纤溶酶原激活剂(Plasminogen activator)为组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)和尿激酶型纤溶酶原激活剂(u-PA), 两者都是分泌型丝氨酸蛋白酶。t-PA主要由血管内皮细胞和平滑肌细胞表达、分泌, 并不断释放到血液中, 而u-PA由动脉粥样硬化病变血管中的巨噬细胞等表达[1]。尿激酶型纤溶酶原激活剂(Urokinase-type plasminogen activator, uPA or u-PA), 又称尿激酶(Urokinase), 最早是从人类尿液中分离出来, 也存在于血液和许多组织的细胞外基质中, 在细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)重塑、细胞迁移、炎症和癌症中发挥重要作用。uPA的主要底物是纤溶酶原(Plasminogen), 可催化纤溶酶原转化为有活性的纤溶酶(Plasmin), 从而触发蛋白水解级联反应, 进而参与溶解血栓或细胞外基质降解。这种级联反应与血管疾病和癌症进展有关[2]。uPA由EGF (Epidermal growth factor)样结构域、Kringle结构域、丝氨酸蛋白酶结构域组成[3]。uPA以无活性的酶原形式分泌, 经蛋白水解酶裂解后被激活, 产生的活性uPA是N端A链(EGF样和Kringle结构域)和C端B链(丝氨酸蛋白酶)由二硫键连接的二聚体。人尿中提取的尿激酶一般是由约54kDa的高分子量尿激酶和约33kDa低分子量尿激酶组成的混合物。
- 本试剂盒检测原理如图1所示。本试剂盒中提供的uPA底物(Substrate)带有AMC基团, uPA通过蛋白水解方式切割底物并释放出荧光物质AMC, 这样通过检测AMC的荧光就可以非常灵敏地检测uPA的酶活性。uPA的活性与荧光强度成正比。AMC的最大激发波长为350nm, 最大发射波长为450nm。



图1. 碧云天尿激酶活性检测试剂盒(荧光法) (P0389)检测原理图。

- 本试剂盒检测灵敏度高, 线性范围宽, 样品用量少。**相较于尿激酶活性检测试剂盒(显色法) (P0385), 本试剂盒的检测效率和灵敏度更高。孵育60分钟, 本试剂盒可以检测低至约0.02IU的uPA, 在0.02-2.5IU活力范围内有良好的线性关系。本试剂盒提供了尿激酶标准溶液(uPA Standard), 可以通过设置标准曲线(图2A), 计算出样品中uPA活力。96孔板中通常1-10 μ l细胞样品足够用于uPA活性检测。如果样品中尿激酶的活性特别低, 可以使用检测时间更加灵活、能孵育过夜的尿激酶活性检测试剂盒(显色法) (P0385)。

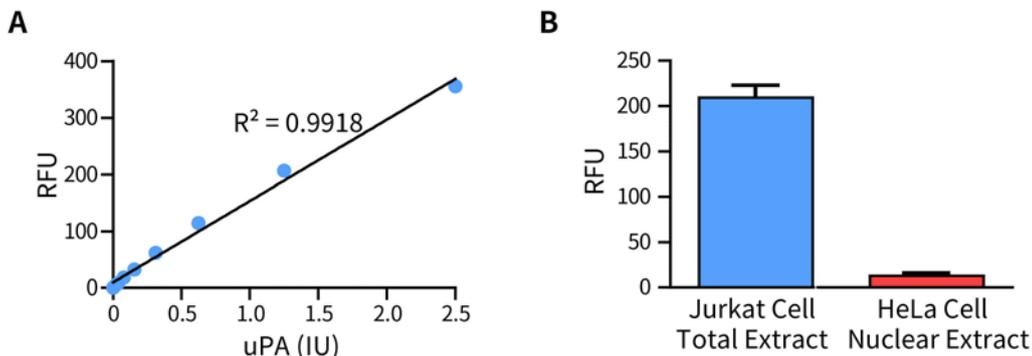


图2. 碧云天尿激酶活性检测试剂盒(荧光法) (P0389)对uPA标准品、Jurkat细胞裂解液及HeLa细胞核抽体物样品的检测效果。图A为本试剂盒检测不同量的uPA (0.02-2.5IU)的荧光值, 图B为本试剂盒检测检测Jurkat全细胞提取液(Jurkat Cell Total Extract)和HeLa细胞核提取液(HeLa Nuclear Extract)中尿激酶活性的荧光值。提取液中的蛋白量均为135 μ g, 测定时间均为60分钟。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- 本试剂盒使用灵活, 检测速度快, 适用范围广。**本试剂盒对Assay Buffer、孵育温度和试剂用量等条件进行了优化, 不仅适合少量样本的检测, 也非常适合高通量筛选(High-throughput screening)的自动化操作系统, 可用于人的血清以及细胞或组织样品等的检测。本试剂盒采用一步法检测, 使用方便、简单、快速, 全程约0.5-1小时即可完成。

- 本试剂盒提供的检测裂解液有一定的通用性。本试剂盒提供了BeyoLysis™ Buffer A for Enzyme Assay，可直接裂解细胞样品用于检测uPA酶活性，也可以用于碧云天生产的其它酶学检测类试剂盒中同样使用BeyoLysis™ Buffer A for Enzyme Assay进行裂解的样品检测，通用性强；而且还可用于检测蛋白浓度、进行SDS-PAGE或一些较易溶解蛋白的Western检测。
- 按照使用操作说明，用于96孔板检测时，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
P0389S-1	BeyoLysis™ Buffer A for Enzyme Assay	25ml
P0389S-2	Assay Buffer	20ml
P0389S-3	uPA Standard (10,000IU/ml)	20μl
P0389S-4	Substrate (10X)	50μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P0389M-1	BeyoLysis™ Buffer A for Enzyme Assay	120ml
P0389M-2	Assay Buffer	100ml
P0389M-3	uPA Standard (10,000IU/ml)	100μl
P0389M-4	Substrate (10X)	250μl
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。其中Substrate (10X)须避光保存并避免反复冻融。

注意事项：

- 由于底物的特殊性，本产品也可以检测组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)、凝血酶或具有胰蛋白酶活性的蛋白酶。如果样品中含有组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)、凝血酶或具有胰蛋白酶活性的蛋白酶，会对尿激酶的活性检测产生干扰，可以在样品检测时同时设置添加尿激酶抑制剂的样品背景对照组，样品和样品背景对照孔之间的信号差即为尿激酶催化释放的AMC的信号值。尿激酶抑制剂推荐碧云天的GGACK (尿激酶抑制剂) (S1630)。
- BeyoLysis™ Buffer A for Enzyme Assay、Assay Buffer和Substrate (10X)需完全解冻并平衡至室温后再使用，否则会影响检测结果。uPA Standard (10,000IU/ml)使用时应置于冰上，使用完毕后各试剂应立即按照试剂盒要求的条件保存。
- 如果使用本试剂盒提供的BeyoLysis™ Buffer A for Enzyme Assay制备样品，并且加入的样品量在本试剂盒的推荐范围内，可以确保反应体系的pH值在适宜的范围。如果使用自行配制的裂解液，请确保加入样品后反应体系的pH值在7.5-8之间，或者确保样品的pH值在7.5-8之间，否则可能会影响检测结果的信号值和稳定性。
- 本试剂盒中体积较小的试剂使用时建议先离心数秒使液体沉降于管底，然后再使用。结冻的试剂必须完全融化并混匀后使用。
- 血清、细胞等裂解样品如果置于4°C保存，用于uPA活性检测时，保存的时间不应超过2天，否则会影响检测结果的准确性。通常细胞等裂解样品宜在-20°C保存，-80°C保存更佳。
- 荧光酶标仪检测时须使用适合荧光检测的黑板或白板，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)或BeyoGold™黑色透明底96孔细胞培养板(平底带盖，独立包装) (FCP965)。
- 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. 样品的准备。

- 血液样品的准备。对于血清样品，将全血在常温如25°C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°C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，将全血用肝素或者EDTA进行抗凝，4°C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°C或-80°C。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100-200μl的比例加入BeyoLysis™ Buffer A for Enzyme Assay，适当吹打，冰浴5-10分钟以充分裂解细胞。4°C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°C或冰上操作。制备好的细胞样品如果不能立即检测，可以-20°C或-80°C冻存。

2. 试剂盒的准备。

- 将BeyoLysis™ Buffer A for Enzyme Assay、Assay Buffer和Substrate (10X)等试剂平衡至室温后分别混匀备用。uPA Standard (10,000IU/ml)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。
- 将Substrate (10X)用Assay Buffer稀释至1X，例如取10μl Substrate (10X)，加入90μl Assay Buffer，混匀即得100μl的1X Substrate。

3. 尿激酶标准曲线的准备。

取适量uPA Standard (10,000IU/ml)，用Assay Buffer将uPA Standard (10,000IU/ml)稀释至一系列浓度梯度：250、125、62.5、31.25、15.63、7.81、3.91、0IU/ml，每个浓度各取10μl加入96孔板中，随后参照步骤4配制检测体系。标准曲线各孔uPA标准品的量分别为2.5、1.25、0.625、0.3125、0.1563、0.0078、0.0039、0IU。

注：也可根据样品中uPA的大概活性，自行设置适宜的uPA浓度进行标准曲线的设置。

4. 检测体系的设置。

参照下表依次加入试剂盒各组分及样品。为确保样品读数在标准曲线范围内，建议进行预实验将待测样品设置多个稀释倍数，以确定待测样品中尿激酶的大致活性，如果数值不在标准曲线范围内，可调整待测样品的稀释倍数。待测样品的稀释倍数记为dil。

Reagent	Blank Control	Standard/ Positive Control	Sample
Assay Buffer	85μl	75μl	85μl
BeyoLysis™ Buffer A for Enzyme Assay	10μl	10μl	-
uPA Standard	-	10μl	-
Sample	-	-	10μl
Total Volume	95μl	95μl	95μl

注：为获得更加可靠的检测结果，推荐每个样品设置3个平行孔。

5. 检测。

a. 振荡混匀约1分钟，确保混合充分。

b. 每孔加入5μl 1X Substrate，混匀。

注：1X Substrate加入后反应会立即开始，在孔数较多的情况下，建议在低温或使用排枪操作以减小各孔间加入Substrate的时间差而导致的误差，混匀操作可在微孔板振荡器上进行，推荐碧云天的BeyoVortex™数字式微孔板振荡器(E6839)。

c. 立即使用酶标仪进行荧光检测。设置酶标仪温度为25°C，激发波长为350nm、发射波长为450nm，每5分钟或10分钟读取一次数值。

注1：连续测定的时间可以根据待测样品中uPA活性进行调整，但是需确保获得6个点以上的数据。对于uPA的酶活较高的样品，建议测定总时间为20分钟或30分钟，对应的测定间隔时间设为2分钟或5分钟；对于uPA的酶活较低的样品，也可以延长测定总时间为1至2小时，对应的测定间隔时间设为10或20分钟。

注2：如果酶标仪没有温控功能，也可以在室温测定，但这样检测出来的是室温条件下的酶活性，此时酶活性可能会偏低一些，不同的实验条件偏低的程度会有所不同。

6. 计算。

a. 计算每个样品孔和空白对照孔的平均荧光值，可分别记录为RFU_{Sample}和RFU_{Blank Control}。RFU, Relative Fluorescence Unit。选取待测样品组荧光强度呈线性关系的时间点的数据用于分析，记录呈线性关系的时间间隔为T，此时间间隔内的吸光度变化量为ΔRFU。可以直接比较各个样品在一定时间内的ΔRFU来确定不同样品的uPA相对活性，但须确保最终时间点时吸光度读数未达平台。

b. 建立标准曲线，将ΔRFU代入标准曲线，即可算出在反应时间内样品中uPA的活力(记录为A)。uPA的标准曲线请参考图2A，uPA在0.02-2.5IU活力范围内有良好的线性关系。尿激酶活性的计算公式如下：

$$\text{uPA Activity (IU/ml)} = A \times \text{dil} / V_{\text{sample}}$$

注：V_{sample}为检测时待测样品的体积(V_{sample} = 10μl = 0.01ml)；

A为步骤6b根据标准曲线确定的uPA的活力(IU)；

dil为步骤4样品稀释倍数。

参考文献：

1. Gonias SL. Am J Physiol Cell Physiol. 2021. 321(4):C721-C734.
2. Tang L, Han X. Biomed Pharmacother. 2013. 67(2):179-82.
3. Jacobs P, Cravador A, Loriau R, Brockly F, Colau B, et al. DNA. 1985. 4(2):139-46.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
P0385S	尿激酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
P0385M	尿激酶活性检测试剂盒(显色法)	500次
P0387S	尿激酶抑制剂筛选试剂盒(显色法)	100次
P0387M	尿激酶抑制剂筛选试剂盒(显色法)	500次
P0389S	尿激酶活性检测试剂盒(荧光法)	100次
P0389M	尿激酶活性检测试剂盒(荧光法)	500次
P0391S	尿激酶抑制剂筛选试剂盒(荧光法)	100次
P0391M	尿激酶抑制剂筛选试剂盒(荧光法)	500次

ST2075-100KIU	尿激酶($\geq 50,000$ IU/mg, Reagent grade)	100KIU
ST2075-500KIU	尿激酶($\geq 50,000$ IU/mg, Reagent grade)	500KIU
ST2075-2500KIU	尿激酶($\geq 50,000$ IU/mg, Reagent grade)	2500KIU

Version 2024.08.30