

GTP酶活性检测试剂盒(显色法)

产品编号	产品名称	包装
P2435S	GTP酶活性检测试剂盒(显色法)	500次
P2435M	GTP酶活性检测试剂盒(显色法)	2500次

产品简介:

- 碧云天研发生产的GTP酶活性检测试剂盒(显色法), 即GTPase Activity Assay Kit (Colorimetric), 是基于GTP酶水解GTP (Guanosine triphosphate)形成GDP (Guanosine diphosphate)并释放一个磷酸二氢盐(dihydrogen phosphate, Pi), 磷酸二氢盐或磷酸盐与特异性黄色染料反应形成绿色复合物, 导致630nm处吸光度(A630nm)升高, A630nm读值与磷酸二氢盐或磷酸盐的摩尔量成正比, 可通过设置磷酸二氢盐或磷酸盐标准曲线计算出样品中磷酸二氢盐或磷酸盐的摩尔量, 从而简单、快速、高灵敏地检测GTP酶的活性(图1)。本试剂盒也适用于小GTP酶(Small GTPase)活性的检测。

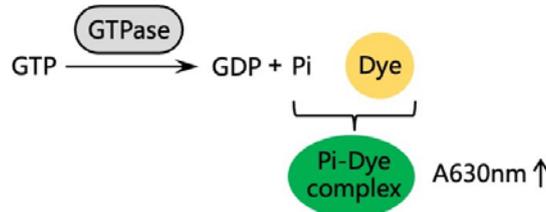


图1. 碧云天GTP酶活性检测试剂盒(显色法) (P2435)的工作原理图。

- GTP酶(GTPase)是可结合GTP并将其水解为GDP一类水解酶统称, 也称G-proteins、GTP-binding proteins, 是调节真核细胞信号转导、细胞增殖、细胞骨架重组和细胞内膜转运等过程的分子开关, GTP酶通过结合和水解GTP, 在“激活”和“静息”状态之间循环: 在外界信号的刺激下, 鸟苷酸交换因子(Guanine nucleotide-exchange factors, GEFs)辅助GTP酶将结合的GDP置换为GTP, GTP酶结合GTP进入激活状态(Active state); 激活状态的GTP酶与下游效应蛋白(Effector protein)相互作用, 从而刺激细胞发生相应的响应; GTP酶激活蛋白(GTPase-activating proteins, GAPs)催化GTP酶结合的GTP水解为GDP, 并释放一个磷酸二氢盐(dihydrogen phosphate, Pi), 此时GTP酶结合GDP进入静息状态(Inactive state), 鸟嘌呤核苷酸解离抑制蛋白(Guanine nucleotide dissociation inhibitors, GDIs)抑制GTP酶释放GDP, 直到GEFs受到刺激信号再次开启新一轮的循环(图2) [1-2]。

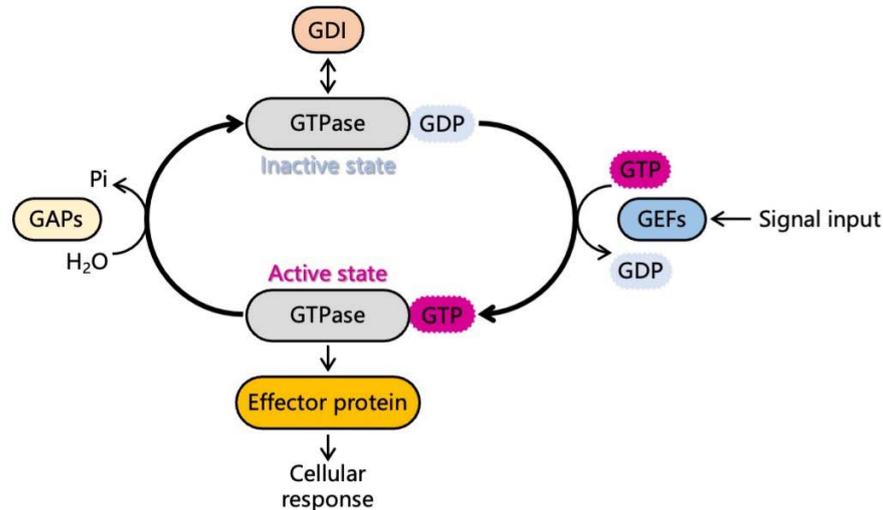


图2. GTP酶在“激活”和“静息”状态之间循环的原理图。

- 小GTP酶(Small GTPase)在人类中已发现超过150个家族成员, 在果蝇(*Drosophila*)、秀丽隐杆线虫(*C. elegans*)、酿酒酵母(*S. cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*S. pombe*)、黏菌(*Dictyostelium*)和植物中也发现了保守的同源物。小GTP酶根据结构和功能被分为5个家族分支: Ras家族、Rho家族、Ran家族、Rab家族和Arf家族。Ras家族本身又被分为6个亚家族: Ras亚家族、Ral亚家族、Rit亚家族、Rap亚家族、Rheb亚家族和Rad亚家族[3]。
- 本试剂盒检测灵敏度高、线性范围宽。按照384孔板的每孔20μl反应体系, 本试剂盒提供的标准品(5mM Phosphate Standard)

在1-12nmol (5-60 μ M)范围内有良好的线性关系(图3A)。本试剂盒还提供了GTP酶阳性对照(GTPase Positive Control), 便于建立检测体系(图3B)。通过标准曲线可以计算出GTP酶活性(Biological activity) (图3C)。

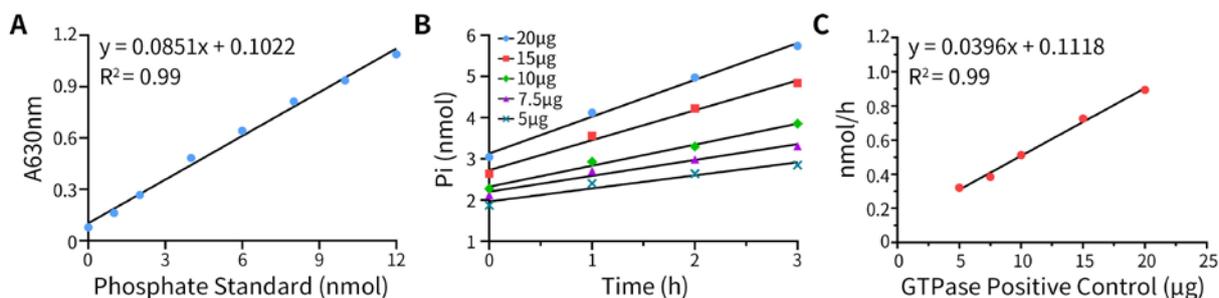


图3. 碧云天GTP酶活性检测试剂盒(显色法) (P2435)用于磷酸盐标准曲线、GTP酶阳性对照和计算GTPase活性的检测效果图。A. 本试剂盒的磷酸盐标准曲线示意图。B. 随着时间增加不同量的GTP酶阳性对照(GTPase Positive Control)水解GTP释放磷酸盐(Pi)摩尔量的示意图。C. 以GTP酶阳性对照质量(μ g)为X轴, 对应单位时间内释放磷酸盐(Pi)摩尔量(nmol/h)为Y轴, 相应拟合直线的斜率即为GTP酶活性(0.0396nmol/h/ μ g)的示意图。相关数据为在384孔板中检测所得, 实际结果因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- 用于96孔板或384孔板检测时, 按照每孔100 μ l或20 μ l反应体系, 本试剂盒小包装可以进行100次或500次检测, 中包装可以进行500次或2500次检测。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
P2435S-1	Assay Buffer	20ml
P2435S-2	GTPase Positive Control (1mg/ml)	80 μ l
P2435S-3	5mM Phosphate Standard	20 μ l
P2435S-4	2mM GTP	250 μ l
P2435S-5	Reagent A	2ml
P2435S-6	Reagent B	1ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P2435M-1	Assay Buffer	100ml
P2435M-2	GTPase Positive Control (1mg/ml)	160 μ l
P2435M-3	5mM Phosphate Standard	100 μ l
P2435M-4	2mM GTP	1.25ml
P2435M-5	Reagent A	10ml
P2435M-6	Reagent B	5ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20 $^{\circ}$ C保存, 一年有效。Reagent A须避光保存。Reagent A和Reagent B 4 $^{\circ}$ C保存, 一年有效。启用后, Reagent A和Reagent B 推荐在4 $^{\circ}$ C保存, 后续使用更便捷。

注意事项:

- 为防止GTP水解释放Pi导致背景信号过高, 2mM GTP须分装后-20 $^{\circ}$ C或更低温度冻存, 尽量避免反复冻融。实验过程中需确保GTP置于冰上。
- **Reagent B在-20 $^{\circ}$ C保存会导致结冻, 须在95 $^{\circ}$ C加热至完全溶解并混匀后使用。**启用后, Reagent B推荐在4 $^{\circ}$ C保存。
- Reagent A呈强酸性, 有腐蚀性, 操作时请小心, 并确保有效防护以避免直接接触人体, 并避免腐蚀其它物品。
- 96孔板或384孔板推荐选购碧云天的BeyoGold™ 96孔细胞培养板(FCP962)或BeyoGold™ 384孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装)(FCP981)。
- 96孔板或384孔板孵育期间, 建议用封板膜(FSF030)或封口膜封板, 以防止样品挥发, 影响酶活检测。
- 清洁剂含有高浓度的磷酸盐, 需确保实验器皿彻底清洗, 防止磷酸盐污染。所有试剂避免被环境中的磷酸盐污染。
- 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:

由于本试剂盒的显色剂呈强碱性, 显色剂加入后会反应底物GTP水解释放Pi导致背景信号升高, 因此本试剂盒不适用于动力学检测

(Kinetic Assay), 仅适用于终点法检测(Endpoint Assay)。终点法检测是指GTP酶与底物GTP反应一定时间后被终止, 通过测量规定反应时间内GTP水解释放Pi的量来检测GTP酶的活性。如果进行完整的检查Pi标准曲线、GTP酶阳性对照、相关样品及4个时间点和三复孔的测试, 建议在384孔板中进行测试; 如果没有384孔板的检测仪器, 也可以使用96孔板进行测试, 但此时需要适当规划相应的样品设置。本使用说明以384孔板及完整的样品和对照组别设置为例进行说明, 如果使用96孔板, 可按5倍比例调整体积。

1. 显色剂的配制。

Reagent A和Reagent B的使用比例为2:1。例如, 2ml Reagent A和1ml Reagent B混合即可获得3ml显色剂。384孔板每孔需要加入5 μ l显色剂。

注1: 显色剂需用现配, 注意避光使用, 4 $^{\circ}$ C可稳定保存一天。

注2: 以下实验步骤以384孔板为例, 若使用96孔板, 将实验体系等比例放大5倍即可。

2. GTP酶反应底物GTP的配制。

使用Assay Buffer稀释2mM GTP 10倍后即可得到200 μ M GTP, 例如取10 μ l GTP加入90 μ l Assay Buffer中, 混匀即得100 μ l 200 μ M GTP。384孔板每孔需要加入5 μ l 200 μ M GTP。

注1: 为防止GTP水解释放Pi导致背景信号过高, 2mM GTP首次溶解后须分装, 于-20 $^{\circ}$ C或更低温度冻存, 避免反复冻融。

注2: 200 μ M GTP建议用现配, 实验过程中须确保200 μ M GTP置于冰上。

3. 样品的去除Pi处理(选做)。

a. 本试剂盒理论上可兼容不超过Pi标准曲线最高值即12nmol (60 μ M)的Pi (含样品本身的Pi及GTP酶反应产生的Pi), 同时由于本试剂盒最终是计算单位时间内释放Pi摩尔量(nmol/h)来确定GTP酶活, 所以通常情况下, 如果样品中Pi含量较低、最终读值不超过Pi标准曲线最高值的情况下, 基本不影响样品中GTP酶活的检测。

b. 对于样品中的Pi过高影响检测的情况, 建议使用Tris、HEPES等不含磷酸盐的缓冲液, 同时需要通过脱盐柱或透析去除Pi。推荐使用碧云天的BeyoDesalt™ G-25系列脱盐柱(P2611、P2613、P2615、P2617、P2619、P2621或P2623)或再生纤维素透析袋(FDM214、FDM303、FDM314、FDM403或FDM414), 或对样品进行适当的稀释。如果条件允许, 建议优先考虑去除Pi。

c. 如果条件有限或不方便进行去除Pi处理, 也可以设置不含GTP底物的背景对照或通过GTP酶失活(如样品100 $^{\circ}$ C高温处理5分钟)的背景对照, 并将样品组的630nm的吸光度值减去相应的背景对照值(选做, 见步骤6和8)。但如果不含GTP底物的背景对照或GTP酶失活的背景对照的读值超过对应样品组的1/3, 仍然建议进行去除Pi处理, 检测结果更理想。

4. Pi标准曲线的设置。

a. 本试剂盒提供Pi标准品。取2 μ l 5mM Phosphate Standard, 加入98 μ l Assay Buffer, 混匀即得100 μ l 100 μ M的Phosphate Standard溶液。按照下表在384孔板中配制Pi标准曲线, 轻轻混匀, 避免气泡。此时Pi浓度(μ M)和物质的量(nmol)分别为0、5、10、20、30、40、50、60 μ M和0、1、2、4、6、8、10、12nmol。为获得更好的检测效果, 建议设置平行孔或三复孔。

NO.	Assay Buffer (μ l)	100 μ M Phosphate (μ l)	Pi (μ M)	Pi (nmol)
1	20	0	0	0
2	19	1	5	1
3	18	2	10	2
4	16	4	20	4
5	14	6	30	6
6	12	8	40	8
7	10	10	50	10
8	8	12	60	12

注1: 100 μ M的Phosphate Standard溶液需用现配, 4 $^{\circ}$ C可稳定保存一天。

注2: 加样过程中须避免气泡, 气泡会影响A630nm读值。

注3: 由于GTP酶反应时间比较长, 建议在步骤5和6的GTP酶阳性对照或样品最后一个时间点前10分钟进行上述标准曲线加样。

b. 转步骤7a。

5. GTP酶阳性对照的设置(选做)。

a. 本试剂盒提供1mg/ml的GTPase Positive Control。设置4个GTP酶浓度梯度(0、2.5、5和10 μ g)和2个反应时间(0和2小时)为例。在1.5ml离心管中, 参考下表, 分别取22、11和5.5 μ l的1mg/ml的GTPase Positive Control, 加入Assay Buffer补平至33 μ l, 混匀, 此时GTPase Positive Control的浓度分别为0.667、0.333和0.167mg/ml, 再取各15 μ l到384孔板中, 则每孔GTPase Positive Control量分别为10、5和2.5 μ g, 空白孔为Assay Buffer。如果需要检测0、1、2和3小时共4个时间点或检测平行孔, 标准品的体积需要加倍。

注: 在配制GTP酶阳性对照时, 须轻轻混匀, 避免气泡, 气泡会影响A630nm读值。

No.	Assay Buffer (μ l)	1mg/ml GTPase Positive Control (μ l)	Concentration of GTPase Positive Control (mg/ml)	Volume (μ l/well)	GTPase Positive Control (μ g/well)
1	33	0	0	15	0
2	27.5	5.5	0.167	15	2.5
3	22	11	0.333	15	5

4	11	22	0.667	15	10
---	----	----	-------	----	----

- b. 37°C孵育, 2个反应时间组分别在0和2小时加入5μl 200μM GTP (1X), 轻轻混匀, 避免气泡。在0和2小时分别加入GTP的反应组对应的GTP酶反应时间分别为2和0小时。
注1: 不同批次阳性对照活性可能稍有差异, 请以实际检测结果为准。
注2: 由于孵育时间较长, 请使用封板膜(FSF030)或封口膜封板, 以防止样品挥发, 影响酶活检测。
- c. 转步骤7a。

6. GTP酶样品的设置。

- a. 通过紫外分光光度法、BCA蛋白浓度测定试剂盒(P0009、P0011)或Bradford蛋白浓度测定试剂盒(P0006、P0006C)测定样品的蛋白浓度。
- b. 用Assay Buffer稀释样品, 建议设置至少6个蛋白浓度梯度。
- c. 按照下表配制每个反应体系, 为获得更好的检测效果, 建议设置至少4个反应时间, 平行孔或三复孔。为减小误差, 建议在1.5ml离心管中配制好N+1个反应体系(例如, 每个蛋白浓度设置4个反应时间、三复孔时N=12, 则每个蛋白浓度需要配制15μl×(12+1)=195μl), 轻轻混匀, 避免气泡, 气泡会影响A630nm读值, 按照每孔15μl加样到384孔板中。

Reagent	Blank Control (optional)	Positive Control (optional)	Sample	Background Control (optional)
Assay Buffer (μl)	15	5	5	5
100μM Phosphate (μl)	-	10	-	-
Sample (μl)	-	-	10	10
Total Volume (μl)	15	15	15	15

注1: 在最终读值不超过Pi标准曲线最高值的情况下, 如果样品未经去除Pi处理, 可设置不含GTP底物的背景对照或通过GTP酶失活(如样品100°C高温处理5分钟)的背景对照(Background Control)。

注2: 对于仅含Assay Buffer的空白对照(Blank Control), 如果GTP酶阳性对照已经包含, 可以不再重复进行设置。仅含Assay Buffer的空白对照可以确定Assay Buffer是否在使用过程中受到环境中磷酸盐的污染。如果A630nm读值明显大于0.1, 表明Assay Buffer被磷酸盐污染, 需更换Assay Buffer。

- d. 37°C孵育, 4个反应组分别在不同时间(例如0、1、2和3小时)加入5μl 200μM GTP (1X), 轻轻混匀, 避免气泡。例如在0、1、2和3小时分别加入GTP的反应组对应的GTP酶反应时间分别为3、2、1和0小时。
注1: 如果设置了“不含GTP底物的背景对照”, 该组别须使用相同体积的Assay Buffer代替200μM GTP (1X)。
注2: 如果首次检测样品活性较高, 后续可只选择0小时和2小时两个时间点进行检测。
- e. 转步骤7a。

7. GTP酶活性的检测。

- a. 各孔加入5μl显色剂, 包括标准曲线组(步骤4)、GTP酶阳性对照组(步骤5, 选做)、样品组(步骤6), 轻轻混匀, 避免气泡。
- b. 37°C孵育20分钟。
- c. 用酶标仪测定630nm的吸光度。

8. GTP酶活性的计算。

- a. **Pi标准曲线的建立:** 以Pi物质的量(nmol)为X轴, 多功能酶标仪读取630nm的吸光度(A630nm)为Y轴, 建立标准曲线(直线线性关系)(如图3A), 该图拟合得到公式 $y = 0.08501x + 0.1022$ 。
- b. 将样品组的630nm的吸光度作为y值代入公式, 求解得到的x值即为每个孔中含有Pi的物质的量(nmol)。
注1: 如果设置了不含GTP底物的背景对照或GTP酶失活的背景对照, 需将样品组的630nm的吸光度减去相应的背景对照值。
注2: 空白对照只要没有受到环境中磷酸盐的污染, 吸光度通常都很低, 且由于Pi标准曲线中已经包含空白对照进行计算, 活性计算时无需减去空白对照组的630nm的吸光度。
- c. **不同浓度样品水解GTP释放Pi与反应时间曲线的建立:** 以反应时间(h)为X轴, 每个孔中GTP酶水解GTP释放Pi的物质的量(nmol)为Y轴, 建立曲线(直线线性关系)(如图3B), 拟合得到公式的斜率(nmol/h)代表相应浓度样品每小时水解GTP释放Pi的物质的量。
- d. **GTPase活性计算:** 以每个孔中含有样品的质量(μg)为X轴, 步骤8c拟合得到公式的斜率(nmol/h)为Y轴, 建立曲线(直线线性关系)(如图3C), 拟合得到公式的斜率(nmol/h/μg)即为GTP酶活性: 每μg样品每小时水解GTP释放Pi的物质的量。

参考文献:

- Vernoud V, Horton AC, Yang Z, Nielsen E. Plant Physiol. 2003. 131(3):1191-208.
- Ito H, Morishita R, Nagata KI. Int J Mol Sci. 2018. 19(7):2121.
- Goitre L, Trapani E, Trabalzini L, Retta SF. Methods Mol Biol. 2014. 1120:1-18.

相关产品:

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

S0196S	Malachite Green Phosphate Detection Kit	500次
S0196M	Malachite Green Phosphate Detection Kit	2500次
P2435S	GTP酶活性检测试剂盒(显色法)	500次
P2435M	GTP酶活性检测试剂盒(显色法)	2500次
FCP962	BeyoGold™ 96孔细胞培养板	50个/箱
FCP981-8pcs	BeyoGold™ 384孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装)	8个/盒
FCP981-48pcs	BeyoGold™ 384孔细胞培养板(平底带盖, 独立包装)	48个/箱

Version 2024.12.13