GENMED 细胞蛋白磷酸酶 1（PP1）活性定磷比色法定量检测试剂盒产品说明书（中文版）

主要用途

GENMED 细胞蛋白磷酸酶 1（PP1）活性定磷比色法定量检测试剂是一种旨在使用特异性底物糖原磷酸化酶 a，在 PP2A 抑制剂存在下，受到 PP1 去磷酸化后，释放出游离磷酸根，与孔雀绿染料发生显色反应后，采用比色法测定其峰值的变化，以此进行测算单位酶活性的权威而经典的技术方法。该技术经过精心研制、成功实验证明的。其适合于各种细胞裂解悬液样品包括免疫沉淀复合物和粗提或部分纯化酶样品的蛋白磷酸化酶 1 活性及其抑制剂的检测。广泛应用于细胞凋亡、蛋白组学、病理生理学、神经病变等研究。产品不含污染性蛋白酶，严格无菌，即到即用，操作简捷，性能稳定，反应优化，检测敏感。

技术背景

蛋白磷酸化酶1（protein phosphatase 1；PP1；EC 3.1.3.48），又称为1型蛋白丝/苏氨酸磷酸化酶，是7个主要丝/苏氨酸磷酸化酶（包括PP1、PP2A、PP2B、PP2C、PP4、PP5、PP6）成员之一，从酵母到人类高度进化保留。其参与调节多种重要的细胞生理功能，包括糖原代谢、细胞分裂、肌肉收缩、信号传导、神经元功能、转录、翻译等，以及与HIV-1转录过程的调节，并且与老年性痴呆等多种疾病密切相关。PP1分子结构表面的3个凹槽及β 12-β 13 Loop环结构，是底物与抑制剂的结合部位；其催化亚体为37kd，调节亚体有2种：目标亚体和抑制亚体。基于特异性底物糖原磷酸化酶a，在PP2A抑制剂福司曲星（fostriecin；FOS）存在的情况下，受到蛋白磷酸化酶1的去磷酸化作用，释放出游离磷酸根，与孔雀绿（malachite green）染料发生显色反应后，在分光光度仪下（660nm波长）产生峰值的变化，由此测定蛋白磷酸化酶1（PP1）的特异活性。

产品内容

GENMED 清理液（Reagent A）	毫升
GENMED 裂解液（Reagent B）	毫升
GENMED 缓冲液（Reagent C）	毫升
GENMED 阴性液（Reagent D）	毫升
GENMED 反应液（Reagent E）	微升
GENMED 终止液（Reagent F）	毫升
GENMED 显色液（Reagent G）	毫升
GENMED 标准液（Reagent H）	微升
产品说明书	1 份

保存方式

保存 GENMED 裂解液（Reagent B）、GENMED 缓冲液（Reagent C）、GENMED 反应液（Reagent E）和 GENMED 显色液（Reagent G）在－20℃冰箱里，避免反复冻融；其余的保存在 4℃冰箱里；GENMED 终止液（Reagent F）和 GENMED 显色液（Reagent G）具有腐蚀性，避免直接用手接触；GENMED 显色液（Reagent G）避免光照，有效保证 6 月

用户自备

15 毫升离心管：用于样品处理的容器
1.5 毫升离心管：用于样品处理和保存的容器
细胞刮脱棒：用于贴壁细胞脱离
（微型）台式离心机：用于样品收集
培养箱：用于孵育反应物
比色皿：用于比色的容器
分光光度仪：用于比色分析

实验步骤

实验开始前，将－20℃冰箱里的试剂盒中的试剂溶液放进冰槽里融化。然后进行下列操作。

一、 样品准备

1. 准备好 25cm^2 细胞培养瓶或 60mm 细胞培养皿的待测培养细胞（5 X 10^6 细胞）
2. 小心加入 xx 毫升预冷的 **GENMED 清理液（Reagent A）**，覆盖生长表面
3. 小心抽去清理液
4. 使用细胞刮脱棒轻柔刮脱细胞
5. 加入 xx 毫升 **GENMED 清理液（Reagent A）**，混匀细胞
6. 移入到预冷的 15 毫升锥形离心管（注意：*悬浮细胞从这一步骤开始*）
7. 放进 4℃台式离心机离心 5 分钟，速度为 300g
8. 小心抽去上清液
9. 加入 xx 微升 **GENMED 裂解液（Reagent B）**，充分混匀
10. 转移到预冷的 1.5 毫升离心管
11. 强力涡旋震荡 15 秒
12. 置于冰槽里孵育 30 分钟
13. 放进 4℃微型台式离心机离心 5 分钟，速度为 16000g（或 13000RPM，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. 移取 2 微升进行蛋白定量测定（注意：*建议使用 GENMED Bradford 蛋白质浓度定量试剂盒－GMS30030.1*）
16. 即刻放进－70℃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等），置于冰槽里（注意：*样品须澄清*）
2. 定好分光光度仪（温度为 30℃）：波长为 660nm，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. 按下表分别加入 **GENMED 阴性液（Reagent D）和 GENMED 标准液（Reagent H）**到每个离心管，混匀
5. 将 1 至 5 号管放进冰槽里备用，避免光照；标准管浓度见下表

管号	**GENMED 阴性液（Reagent D）**	**GENMED 标准液（Reagent H）**	**测定体系标准磷浓度**

1	0	xx 微升	xx 微摩尔/升
2	xx 微升	xx 微升	xx 微摩尔/升
3	xx 微升	xx 微升	xx 微摩尔/升
4	xx 微升	xx 微升	xx 微摩尔/升
5	xx 微升	0	0

三、 标准曲线测定

1. 移取 xx 微升 **GENMED 阴性液（Reagent D）**到新的比色皿
2. 加入 40 微升上述配制的标准液
3. 在 30℃温度下孵育 10 分钟
4. 加入 xx 微升 **GENMED 终止液（Reagent F）**，混匀
5. 加入 xx 微升 **GENMED 显色液（Reagent G）**，混匀
6. 室温下静置 15 分钟，避免光照
7. 即刻放进分光光度仪检测：获得吸光读数
8. 重复实验步骤 1 至 7 四次
9. 构建标准曲线：纵座标（Y 轴）为吸光单位（A）；横座标（X 轴）为标准磷浓度（微摩尔/升）

四、 样品背景测定

1. 移取 xx 微升 **GENMED 缓冲液（Reagent C）**到新的比色皿
2. 加入 40 微升待测样品（总量 20 微克组织裂解萃取液蛋白）
3. 在 30℃温度下孵育 10 分钟
4. 加入 xx 微升 **GENMED 终止液（Reagent F）**，混匀
5. 加入 xx 微升 **GENMED 显色液（Reagent G）**，混匀
6. 室温下静置 15 分钟，避免光照
7. 即刻放进分光光度仪检测：获得样品背景吸光读数
8. 根据标准曲线获得样品背景对应磷浓度（微摩尔/升）

五、 样品活性测定

1. 移取 xx 微升 **GENMED 缓冲液（Reagent C）**到新的比色皿
2. 加入 40 微升待测样品（总量 20 微克组织裂解萃取液蛋白）
3. 在 30℃温度下孵育 2 分钟
4. 加入 xx 微升 **GENMED 反应液（Reagent E）**
5. 在 30℃温度下孵育 10 分钟
6. 加入 xx 微升 **GENMED 终止液（Reagent F）**，混匀
7. 加入 xx 微升 **GENMED 显色液（Reagent G）**，混匀
8. 室温下静置 15 分钟，避免光照
9. 即刻放进分光光度仪检测：获得样品活性吸光读数
10. 根据标准曲线获得样品活性对应磷浓度（微摩尔/升）

六、 计算样品活性

注意事项

1. 本产品为 25 次操作，包括 5 次标准测定
2. 操作时，须戴手套
3. **GENMED 终止液（Reagent F）**和 **GENMED 显色液（Reagent G）**具有腐蚀性，避免直接用手接触
4. 样品切忌使用磷酸缓冲液和脱氧胆酸纳处理
5. 如果使用免疫沉淀复合物作为待测样品，建议使用 GENMED 通用型蛋白免疫共沉淀（蛋白 A 树脂）试剂盒－GMS30029.1
6. 比色测定后，比色皿须清洗彻底
7. 建议使用比色皿测定
8. 如果使用 96 孔板测定，建议反应孵育时，置于平式摇荡仪摇荡孵育，速度为 50RPM
9. 如果用户没有 660nm 波长，可以使用 600 至 660nm 的任一波长替代
10. 显示绿色表明具有较强酶活性
11. 空白对照读数应小于 0.2
12. 建议待测样本蛋白浓度为 20 微克/40 微升；如果样本酶活性过低或过高，则可以增加或降低样本量；（本公司提供 GENMED Bradford 蛋白质浓度定量试剂盒－GMS30030.1）
13. 可以使用 PP1 抑制剂（Inhibitor 2；I2）作为抑制剂对照或阴性对照
14. 蛋白磷酸化酶 1 活性单位浓度定义：在 30℃温度下，pH 7.4 的情况下，每单位酶在单位时间内（每分钟）释放 1 微摩尔的磷
15. 本公司提供系列磷酸化酶检测试剂产品

质量标准

1. 本产品经鉴定性能稳定
2. 本产品经鉴定检测准确