

细胞 PTEN 活性定磷比色法定量检测试剂盒产品说明书

主要用途

细胞 PTEN 活性定磷比色法定量检测试剂是一种旨在使用特异性合成底物磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸 (PIP3)，在 PTEN 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。该技术由大师级科学家精心研制、成功实验证明的。其适合于各种细胞裂解悬液样品的 PTEN 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

细胞张力蛋白同源在10号染色体缺失性磷酸酶 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten; PTEN; EC3.1.3.67)，又称为多发性晚期肿瘤突变基因1 (mutated in multiple advanced cancers 1; MMAC1)，是一个肿瘤抑制基因，位于染色体10q23.3，转录产物515kb，蛋白产物175氨基酸。PTEN蛋白含有一酪蛋白磷酸酶的功能区和约175个氨基酸左右的与骨架蛋白张力蛋白 (tenasin)、辅助蛋白 (auxilin) 同源的区域，是一种双重特异性磷酸酶，能使酪氨酸、丝氨酸、苏氨酸、磷脂酰肌醇 (phosphoinositide) 等去磷酸化。PTEN具有调节细胞周期、防止细胞过度生长和分裂、参与细胞凋亡、粘附、迁移、浸润，控制细胞内磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸 (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate; PIP3) 水平，调控Akt/PKB信号通路等功能。PTEN基因突变和缺失将导致肿瘤发生、发展和转移，以及多发性错构瘤综合征 (Cowden syndrome) 等。基于底物磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸，在 PTEN 的催化下，水解产生磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 (PIP2)，同时释放出游离磷酸根，进而与孔雀绿染料发生显色反应产生其峰值的变化 (660nm波长)，以此测算PTEN的活性。

产品内容

清理液 (Reagent A)	120 毫升
裂解液 (Reagent B)	10 毫升
缓冲液 (Reagent C)	1 毫升
阴性液 (Reagent D)	1 毫升
反应液 (Reagent E)	200 微升
终止液 (Reagent F)	1 毫升
显色液 (Reagent G)	4 毫升
标准液 (Reagent H)	500 微升
产品说明书	1 份

保存方式

保存裂解液 (Reagent B)、缓冲液 (Reagent C)、反应液 (Reagent E) 和显色液 (Reagent G) 在-20℃冰箱里，避免反复冻融；其余的保存在 4℃冰箱里；终止液 (Reagent F) 和显色液 (Reagent G) 具有腐蚀性，避免直接用手接触；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 25cm² 细胞培养瓶或 60mm 细胞培养皿的待测培养细胞（5 X 10⁶ 细胞）
2. 小心加入 3 毫升预冷的**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 3 毫升**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 500 微升**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 Bradford 蛋白质浓度定量试剂盒—HL30030.1*）
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. 设定好分光光度仪（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**阴性液（Reagent D）**和**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	阴性液（Reagent D）	标准液（Reagent H）	测定体系标准磷浓度
1	0	100 微升	20 微摩尔/升
2	25 微升	75 微升	15 微摩尔/升
3	50 微升	50 微升	10 微摩尔/升
4	75 微升	25 微升	5 微摩尔/升
5	100 微升	0	0

三、标准曲线测定

1. 移取 20 微升**阴性液（Reagent D）**到新的比色皿
2. 加入 5 微升上述配制的标准液
3. 在 37℃ 温度下孵育 10 分钟
4. 加入 8 微升**终止液（Reagent F）**，混匀

- 加入 100 微升**显色液 (Reagent G)**，混匀
- 室温下静置 15 分钟，避免光照
- 即刻放进分光光度仪检测：获得吸光读数
- 重复实验步骤 1 至 7 四次
- 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

- 移取 20 微升**缓冲液 (Reagent C)** 到新的比色皿
- 加入 5 微升待测样品 (总量 100 微克细胞裂解萃取液蛋白)
- 在 37℃ 温度下孵育 10 分钟
- 加入 8 微升**终止液 (Reagent F)**，混匀
- 加入 100 微升**显色液 (Reagent G)**，混匀
- 室温下静置 15 分钟，避免光照
- 即刻放进分光光度仪检测：获得吸光读数
- 根据标准曲线获得样品背景对应磷浓度

五、样品活性测定

- 移取 10 微升**缓冲液 (Reagent C)** 到新的比色皿
- 加入 5 微升待测样品 (总量 100 微克细胞裂解萃取液蛋白)
- 在 37℃ 温度下孵育 2 分钟
- 加入 10 微升**反应液 (Reagent E)**
- 在 37℃ 温度下孵育 10 分钟
- 加入 8 微升**终止液 (Reagent F)**，混匀
- 加入 100 微升**显色液 (Reagent G)**，混匀
- 室温下静置 15 分钟，避免光照
- 即刻放进分光光度仪检测：获得吸光读数
- 根据标准曲线获得样品活性对应磷浓度

六、计算样品活性

{[根据标准曲线获得样品活性对应磷浓度 (微摩尔/升) - 根据标准曲线获得样品背景对应磷浓度 (微摩尔/升)] X 5 (体系倍数) X 样品稀释倍数} ÷ 10 (反应时间; 分钟) = 纳摩尔磷/毫升/分钟 ÷ (样品蛋白浓度) 毫克/毫升 = 纳摩尔磷/毫克/分钟

注意事项

- 本产品为 25 次操作，包括 5 次标准测定
- 操作时，避免污染母液
- 操作时，须戴手套
- 终止液 (Reagent F)** 和 **显色液 (Reagent G)** 具有腐蚀性，避免直接用手接触
- 样品切忌使用磷酸缓冲液和脱氧胆酸钠处理
- 比色测定后，比色皿须清洗彻底
- 如果用户没有 660nm 波长，可以使用 600 至 660nm 的任一波长替代
- 显示绿色表明具有较强酶活性
- 空白对照读数应小于 0.2
- 建议待测样本蛋白浓度为 100 微克/5 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 Bradford 蛋白质浓度定量试剂盒—HL30030.1)

11. 钙调神经磷酸酶活性单位浓度定义：在 37℃ 温度下，pH 8.0 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
12. 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