

尿激酶抑制剂筛选试剂盒(荧光法)

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|--------|------------------|------|
| 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 |

产品简介:

- 碧云天研发的尿激酶抑制剂筛选试剂盒(荧光法) (Urokinase Inhibitor Screening Kit, Fluorometric), 又称uPA Inhibitor Screening Kit、u-Plasminogen Activator Inhibitor Screening Kit或PLAU Inhibitor Screening 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、灵敏地筛选或检测尿激酶抑制剂(uPA inhibitor)的试剂盒。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。
- 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荧光就可以非常灵敏地检测uPA的酶活性。如果在反应体系中加入uPA抑制剂(inhibitor), 荧光产物AMC的生成就会受到抑制。荧光强度与抑制剂的抑制效果成反比, 这样就可以检测出抑制剂的抑制效果。AMC的最大激发波长为350nm, 最大发射波长为450nm。



图1. 碧云天尿激酶抑制剂筛选试剂盒(荧光法) (P0391)筛选尿激酶抑制剂的原理图。

- **本试剂盒检测灵敏性好, 而且特异性强。**本试剂盒中提供了尿激酶(uPA)、尿激酶底物(Substrate)、阳性对照尿激酶抑制剂GGACK, 并且对尿激酶和底物的使用量进行了优化, 不仅能检测出IC₅₀较低的抑制剂, 也能检测出IC₅₀较高的抑制剂。本试剂盒提供的GGACK是一种不可逆的尿激酶抑制剂, 本试剂盒对GGACK的检测效果如图2所示, IC₅₀约为100nM-300nM。

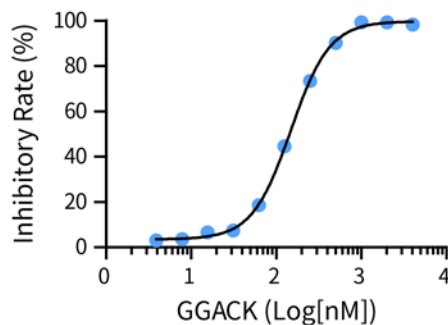


图2. 碧云天尿激酶抑制剂筛选试剂盒(荧光法) (P0391)检测GGACK的效果图。尿激酶底物(Substrate)加入反应体系, 孵育30分钟进行荧光测定。如图所示, GGACK的IC₅₀约为125nM。实际检测结果可能会因样品和检测条件等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- **本试剂盒兼容性强。**常用溶剂如DMSO、无水乙醇、甘油等对本试剂盒的检测结果影响较小, 实测反应体系中DMSO、无水乙醇或甘油含量达20%时, 孵育1小时的信号下降分别不超过10%、8%和6%。去垢剂如Triton X-100等的含量在1.5%时孵育1小时的信号下降不超过15%。检测时通过设置溶剂对照, 可以有效消除溶剂对于检测体系的影响。
- 碧云天同时提供基于显色法的尿激酶抑制剂筛选试剂盒(P0387)。
- 按照使用说明操作, 对于96孔板, 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 |
|----------|-----------------|-------|
| P0391S-1 | Assay Buffer | 20ml |
| P0391S-2 | uPA | 200µl |
| P0391S-3 | Substrate (10X) | 50µl |
| P0391S-4 | GGACK (10mM) | 10µl |
| — | 说明书 | 1份 |

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|----------|-----------------|-------|
| P0391M-1 | Assay Buffer | 100ml |
| P0391M-2 | uPA | 1ml |
| P0391M-3 | Substrate (10X) | 250µl |
| P0391M-4 | GGACK (10mM) | 50µl |
| — | 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, Substrate (10X)与GGACK (10mM)须避免反复冻融。

注意事项:

- Assay Buffer、Substrate (10X)、GGACK (10mM)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。
- 本试剂盒终稿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。
- 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)。
- 确保加入样品后反应体系的pH值在7.5-8之间, 或确保样品的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。
- 待测抑制剂样品的溶剂可能会对检测产生干扰, 推荐使用本试剂盒提供的Assay Buffer作为溶剂用于配制、稀释样品。如果样品必须用其它试剂配制、稀释, 请进行一定的测试, 并在对照孔中添加与样品等体积的溶剂以排除干扰。
- 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(待测抑制剂)的准备。

取适量待测抑制剂样品, 用Assay Buffer、DMSO等适当的溶剂配制成适宜浓度的溶液, 如果有必要可以配制成适当的浓度梯度待用。

2. 试剂盒的准备。

- 将Assay Buffer、Substrate (10X)和GGACK (10mM)等试剂平衡至室温后分别混匀备用。uPA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。
- 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. 阳性对照的准备。

本试剂盒提供的阳性对照抑制剂GGACK浓度为10mM, 配制在双蒸水中。用户可以根据需要使用与待测抑制剂一样的溶剂稀释成所需浓度或浓度梯度。通常GGACK的IC₅₀约为100-200nM, 使用本试剂盒检测GGACK的抑制效果参考图2。

4. 样品测定。

- 根据样品数量(包括100%酶活性对照、阳性对照及样品), 参考下表配制适量的Assay Reagent并注意混合均匀。

| | 1 sample | 5 samples | 10 samples | 20 samples |
|--------------|----------|-----------|------------|------------|
| Assay Buffer | 88µl | 440µl | 880µl | 1.76ml |
| uPA | 2µl | 10µl | 20µl | 40µl |

- 参考下表, 使用96孔黑板设置各组别反应体系, 并按照下表依次加入各检测试剂和样品。加入待测样品后, 混匀。为获得更加可靠的检测结果, 建议每个样品设置3个平行孔。

| Reagent | Blank Control | 100% Activity Control | Positive Control | Sample Group |
|----------------|---------------|-----------------------|------------------|--------------|
| Assay Buffer | 90µl | - | - | - |
| Assay Reagent | - | 90µl | 90µl | 90µl |
| GGACK | - | - | 5µl | - |
| Sample Solvent | 5µl | 5µl | - | - |
| Sample | - | - | - | 5µl |

| | | | | |
|--------------|------|------|------|------|
| Total Volume | 95µl | 95µl | 95µl | 95µl |
|--------------|------|------|------|------|

注：Sample Solvent是指配制和稀释待测抑制剂所用的溶剂。如果特定的溶剂对于检测体系的干扰比较大，可以减少溶剂和待测样品的用量至1-3µl，同时相应地增加Assay Buffer的用量。

- c. 各孔快速加入5µl 1X Substrate，混匀。

注1：1X 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)。

注2：也可在步骤4b，待测样品加入并匀混后先37°C孵育10-30分钟，再进行步骤4c加入1X Substrate。部分抑制剂对uPA活性的抑制可能具有时间依赖性，待测样品加入后在37°C孵育时间的长短可能会影响待测抑制剂及阳性对照的IC₅₀值，建议通过预实验确定未知抑制剂比较适合的孵育时间。

- d. 37°C避光孵育30-60分钟，使用多功能酶标仪进行荧光测定。激发波长为350nm，发射波长为450nm。当荧光读数偏低时，也可适当延长孵育时间至2小时。

5. 计算：

- a. 计算各组的平均荧光值，可分别记录为RFU_{Sample Group}、RFU_{Blank Control}、RFU_{100% Activity Control}和RFU_{Positive Control}。RFU, Relative Fluorescence Unit。
- b. 计算每个样品的抑制百分率。计算公式如下：
抑制率(Inhibitory rate) (%) = $(\text{RFU}_{100\% \text{ Activity Control}} - \text{RFU}_{\text{Sample Group}}) / (\text{RFU}_{100\% \text{ Activity Control}} - \text{RFU}_{\text{Blank Control}}) \times 100\%$
- c. 对于检测发现有效的抑制剂，通过检测该抑制剂的剂量效应就可以计算出该抑制剂的IC₅₀。使用本试剂盒检测GGACK对于uPA的抑制作用的检测结果请参考图2。

参考文献：

1. Tang L, Han X. Biomed Pharmacother. 2013. 67(2):179-82.
2. Jacobs P, Cravador A, Loriau R, Brockly F, Colau B, et al. DNA. 1985. 4(2):139-46.
3. Kiyan J, Kiyan R, Haller H, Dumler I. EMBO J. 2005. 24(10):1787-97.

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(≥50,000IU/mg, Reagent grade) | 100KIU |
| ST2075-500KIU | 尿激酶(≥50,000IU/mg, Reagent grade) | 500KIU |
| ST2075-2500KIU | 尿激酶(≥50,000IU/mg, Reagent grade) | 2500KIU |

Version 2024.08.30