



氯霉素乙酰转移酶检测试剂盒

(CAT Assay Kit)

产品说明:

氯霉素乙酰转移酶报告基因(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)能将乙酰基从乙酰辅酶A转移到氯霉素上。该反应通常通过测量放射性标记的底物而量化,方法繁杂,耗费时间,且成本较高。本试剂盒采用荧光测定的方法,检测CAT活性,它的灵敏度接近同位素测定方法,而操作极为简便、快捷,成本也大为降低。使用通用裂解缓冲液,能与其他类型的报告基因检测和蛋白含量检测兼容。

产品内容与储存方法:

名称	数量	保存条件
5x Universal Lysis Buffer (通用裂解液)	25 ml	-20℃
5x CAT Assay Buffer (CAT反应缓冲液)	1 ml	-20℃
Chloramphenicol (氯霉素)	0.5 ml	-20℃
AcCoA (乙酰辅酶A)	0.5 ml	-20℃
Fluo Assay Buffer (荧光反应缓冲液)	10 ml	-20℃
Fluo Reagent A (荧光试剂A)	0.2 ml	-20℃
Fluo Reagent B (荧光试剂B)	0.2 ml	-20℃

可作100次CAT检测。低温运输, -20℃或-80℃避光保存。有效期6个月。

所需其它试剂:

使用者需准备PBS、双蒸水等。

操作方法:

裂解细胞:

- 1) 新鲜配制裂解液: 临用前, 取适量5xUniversal Lysis Buffer (ULB), 用双蒸水稀释至1xULB, 混匀。1xULB可在4℃存放数周。
- 2) 细胞清洗: 倾去培养板/皿中的培养液, 加入足量PBS, 轻轻洗涤细胞。完全倾去洗涤液。
- 3) 细胞裂解: 推荐按照表中的体积, 在孔/皿中加入1xULB, 混匀。培养板可在微型振荡器上震荡5~10 min; 培养皿可直接用细胞刮刀刮下细胞, 将细胞悬液移入1.5 ml离心管, 在涡旋振荡器上充分混悬震荡30秒。裂解细胞悬液离心1 min, 取上清作荧光测定。

CAT反应:

反应前, 在室温待CAT Assay Buffer和反应底物Chloramphenicol及AcCoA溶液溶化, 置冰上。每10个反应, 按次序混合250 μ l 双蒸水、100 μ l 5x CAT Assay Buffer、50 μ l Chloramphenicol、50 μ l AcCoA, 混匀后在96孔板或微量离心管中分10份(45 μ l)。每孔/管中加入5 μ l细胞裂解上清, 于37℃孵育30 min至3小时(标准反应时间为1小时)。应

设置同等细胞数的非转染细胞裂解上清作对照。

荧光测定:

测定前，在室温待Fluo Assay Buffer和Fluo Reagent B溶液溶化。每10个测定，按次序混合1 ml Fluo Assay Buffer、20 μ l Fluo Reagent A、20 μ l Fluo Reagent B，混匀配成荧光测定液。将CAT反应混合液50 μ l转入荧光测定板的样品孔中，每孔加入100 μ l荧光测定液，室温放置1~2 min。在96孔板荧光测定仪上，采用340 nm激发波长、450 nm发射波长，测定荧光强度。非转染细胞的荧光值为荧光本底。

注意事项:

- 1) AcCoA 溶液避免反复冻融，可分成小份冻存。Fluo Reagent A溶液应盖严存放，避免蒸发。
- 2) 细胞裂解液可于-20℃长期保存。
- 3) 细胞裂解液用量过多，会增加荧光本底。如细胞数量较多时，可用PBS稀释细胞裂解液至较低浓度后，进行CAT反应。由于CAT催化反应的线性范围通常较窄，适当减少细胞裂解液用量，还有助于增加实验的精确度。
- 4) CAT活性较低时，可适当延长CAT反应的时间。但反应时间过长，也会增加荧光本底。
- 5) 本试剂产生的荧光可稳定1小时以上。
- 6) 如要准确定量测定CAT活性，需要通过同时测定CAT酶标准品的系列荧光值，绘制标准曲线，以计算样品的酶活性。

表：不同容器细胞所需1xULB的体积。

96孔板	48孔板	24孔板	12孔板	6孔板	35 mm平皿	60 mm平皿
80 μ l	120 μ l	180 μ l	300 μ l	600 μ l	600 μ l	1000 μ l