碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订货热线: 400-1683301或800-8283301
订货e-mail: order@beyotime.com
技术咨询: info@beyotime.com
网址: http://www.beyotime.com

碧云天网站 微信公众号

冠状病毒M^{pro}/3CL^{pro}活性荧光检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
P0313S	冠状病毒M^{pro}/3CL^{pro}活性荧光检测试剂盒	100次
P0313M	冠状病毒M^{pro}/3CL^{pro}活性荧光检测试剂盒	500次

产品简介：

- 碧云天研发的冠状病毒M^{pro}/3CL^{pro}活性荧光检测试剂盒(Coronavirus M^{pro}/3CL^{pro} Activity Fluorometric Assay Kit)是一种用荧光法快速高灵敏检测冠状病毒主蛋白酶(main protease, 简称M^{pro}，也称3C-like protease，简称3CL^{pro})活性的试剂盒。
- 2019年底由新型冠状病毒引起的肺炎疫情，从2020年初开始在全球大流行，感染病例快速上升，引发全球关注。该病毒被世界卫生组织(WHO)命名为2019-nCoV，被国际病毒分类委员会命名为严重急性呼吸综合征冠状病毒2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)。由新型冠状病毒导致的疾病，被世界卫生组织正式命名为冠状病毒疾病2019 (Corona Virus Disease 2019, COVID-19)，通常称为新型冠状病毒肺炎，简称“新冠肺炎”。
- 新型冠状病毒(2019-nCoV)属于单正链的RNA病毒，与SARS-CoV以及MERS-CoV具有较高的同源性，该病毒感染进入宿主细胞后，在宿主细胞的帮助下，其遗传物质RNA的ORF1a/b首先翻译表达出两条多聚蛋白前体(pp1a和pp1ab)，多聚蛋白前体在主蛋白酶(main protease, 简称M^{pro})和木瓜样蛋白酶(papain like proteases)的作用下发生分子内的切割产生多个非结构蛋白。M^{pro}也被称为3C-like protease (3CL^{pro})，因为其切割位点的特异性与微小RNA病毒(picornavirus)的3C蛋白酶(3C protease)很相似，两者并称为M^{pro}/3CL^{pro}。多聚蛋白前体产生的非结构蛋白参与了病毒亚基因RNA和四个结构蛋白(envelope/E蛋白、membrane/M蛋白、spike/S蛋白和nucleocapsid/N蛋白)的产生，进而完成子代病毒的繁衍与释放。由于M^{pro}蛋白酶在病毒的生命周期中起到了至关重要的作用，且人体内没有同源蛋白，故M^{pro}主蛋白酶是一个抗病毒药物研发的理想靶点。
- 2019-nCoV M^{pro}/3CL^{pro}与SARS-CoV M^{pro}/3CL^{pro}只差12个氨基酸，同源性大于96%，两者结构基本一致，本试剂盒中使用的阳性对照2019-nCoV M^{pro}/3CL^{pro}是碧云天采用自主研发的PerfectProtein™蛋白表达技术平台纯化而来，使表达的重组2019-nCoV M^{pro}/3CL^{pro}蛋白没有任何额外的标签，没有任何一个额外的氨基酸，确保与2019-nCoV病毒的M^{pro}/3CL^{pro}氨基酸序列完全一致，便于检测体系的建立和酶活的比较。
- 冠状病毒M^{pro}/3CL^{pro}活性检测试剂盒采用荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)的方法，其检测原理如下。MCA是荧光供体(Donor)，Dnp是荧光受体(Acceptor)或称为淬灭基团(Quencher)，这两个荧光基团的吸收光谱有一定的重叠，当这两个荧光基团间的距离合适时(一般7-10nm)，荧光能量由供体向受体转移，导致供体荧光分子自身的荧光强度衰减。MCA和Dnp被连接到M^{pro}/3CL^{pro}蛋白酶的天然底物(Substrate)，即MCA-AVLQSGFR-Lys(Dnp)-Lys-NH_2 (P9731)的两端。当M^{pro}/3CL^{pro}蛋白酶没有切割该底物时，两个基团足够接近，发生荧光共振能量转移，即Dnp可淬灭MCA荧光而检测不到荧光；当该底物被M^{pro}/3CL^{pro}蛋白酶切割后，多肽的首尾两端分离，两个基团分开，MCA荧光不再被Dnp淬灭，即可检测到MCA荧光，这样通过荧光检测就可以非常灵敏地检测M^{pro}/3CL^{pro}蛋白酶的酶活性。MCA的最大激发波长为325nm，最大发射波长为393nm。本试剂盒的检测原理请参考图1。

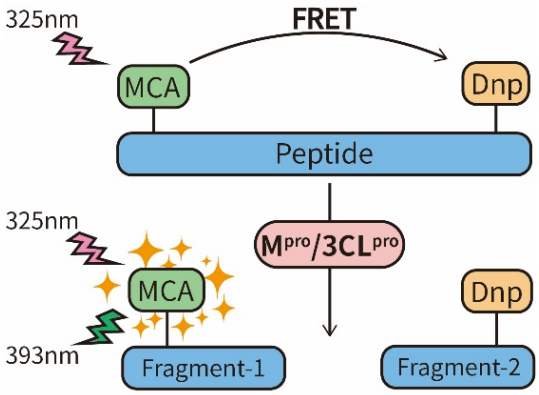

图1. 碧云天冠状病毒M^{pro}/3CL^{pro}活性荧光检测试剂盒检测原理图。

- 本试剂盒内提供了MCA标准溶液，MCA标准品在0.2-50μM范围内有良好的线性关系。可以通过设置标准曲线，计算出样品中Mpro/3CLpro蛋白酶的活性。
- 本试剂盒可以检测不同类型样本的冠状病毒Mpro/3CLpro酶活力，包括新冠病毒、含新冠病毒的细胞或动物组织、表达Mpro/3CLpro酶的细胞或组织裂解液或纯化的Mpro/3CLpro酶等。
- 用于96孔板检测时，本试剂盒小包装P0313S可以进行100次检测，本试剂盒中包装P0313M可以进行500次检测。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
P0313S-1	Assay Buffer	20ml
P0313S-2	2019-nCoV M^{pro}/$3CL^{pro}$ (1mg/ml)	10μl
P0313S-3	Substrate	400μl
P0313S-4	MCA Standard (10mM)	20μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P0313M-1	Assay Buffer	100ml
P0313M-2	2019-nCoV M^{pro}/$3CL^{pro}$ (1mg/ml)	20μl
P0313M-3	Substrate	2ml
P0313M-4	MCA Standard (10mM)	100μl
—	说明书	1份

保存条件：

-20ºC保存，一年有效。其中P0313-3 Substrate和P0313-4 MCA Standard (10mM)需避光保存。

注意事项：

- 本产品不同批号的本产品可能存在Substrate的提供量和使用量不同的问题，请注意按照说明书进行相应操作。
- Assay Buffer、Substrate和MCA Standard (10mM)需要完全解冻并平衡至室温后再使用，否则可能会影响检测结果。2019-nCoV Mpro/3CLpro (1mg/ml)的使用应在冰上进行。使用完毕后各试剂应立即按照试剂盒要求的条件保存。
- 请确保样品pH值在7-8之间，或加入样品后反应体系的pH值在7-8之间，否则可能会影响检测结果的信号值和稳定性。
- 待测样品裂解液是指裂解和稀释待测样品所用的裂解液，即病毒裂解液或含病毒的细胞、组织裂解液的稀释液，该溶液可能会对检测产生干扰，推荐用本试剂盒提供的Assay Buffer为溶剂稀释待测样品。体积较少的试剂首次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。
- 检测时建议使用96孔黑板，推荐选购碧云天的BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(FCP966)。
- 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. 试剂盒的准备：

融解Assay Buffer、Substrate和MCA Standard并平衡至室温，轻轻混匀后Substrate和MCA Standard略离心使溶液积聚于管底。使用完毕后宜立即-20ºC保存。

2. 阳性对照的准备：

根据实验目的或者参考图2B取适量的2019-nCoV M^{pro}/$3CL^{pro}$稀释至一定的浓度。例如取1μl 2019-nCoV M^{pro}/$3CL^{pro}$ (1mg/ml)，加入19μl Assay Buffer，混匀，即得50μg/ml的2019-nCoV M^{pro}/$3CL^{pro}$。反应体系中若加入10μl 50μg/ml的2019-nCoV M^{pro}/$3CL^{pro}$，则2019-nCoV M^{pro}/$3CL^{pro}$蛋白量为0.5μg。

3. MCA标准曲线设置：

取2μl MCA Standard (10mM)，加入198μl Assay Buffer，混匀，即为200μl 100μM的MCA溶液，分别取0、0.5、1、2、4、6、8、10μl的100μM MCA溶液加入96孔板中，并用Assay Buffer补足至100μl，此时，MCA标准曲线的各孔MCA分别为0、0.5、1、2、4、6、8、10μM或0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1nmol。也可自行设置各孔MCA浓度进行标准曲线的设定。

4. 检测体系的设置：

参照下表依次加入试剂盒各组分及样品。初次检测时，待测样品可以稀释一系列浓度梯度，确保最终检测值在标准曲线线性范围内。待测样品的稀释倍数记为dil。

待测样品	空白对照	阳性对照	待测样品
Assay Buffer	86μl	76μl	86μl
稀释后的2019-nCoV M^{pro}/$3CL^{pro}$	-	10μl	-
待测样品裂解液	10μl	10μl	-
待测样品	-	-	10μl
总体积	96μl	96μl	96μl

注1：待测样品裂解液是指用于裂解和稀释待测样品所用的溶液，即病毒裂解液或含病毒的细胞、组织裂解液的稀释液。

注2：为获得更加可靠的检测结果，推荐每个样品设置3个复孔。

5. 检测：

a. 振荡混匀1-2分钟，确保混合充分。

b. 除MCA标准品孔外每孔加入4μl Substrate，混匀。**注：**加入Substrate后反应会立即开始，如果孔数较多的情况下，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，混匀操作可在培养板振荡器上进行。

c. 混匀后立即使用荧光酶标仪进行荧光测定。设置荧光酶标仪温度为37ºC，激发波长为325nm，发射波长为393nm。每1分钟读取一次数值。

注1：连续测定的时间可以根据待测样品中M^{pro}/$3CL^{pro}$的酶活性进行调整，但是需确保获得6个点以上的数据。对于M^{pro}/$3CL^{pro}$的酶活较高的样品，建议测定总时间为5分钟或10分钟，对应的测定间隔时间设为30秒或1分钟；对于M^{pro}/$3CL^{pro}$的酶活很低的样品，可以延长测定总时间为10、15或者20分钟，对应的测定间隔时间设为2、3或4分钟。也可以连续测定20分钟，每隔1分钟测定1次。

注2：本试剂盒中的2019-nCoV M^{pro}/$3CL^{pro}$活性较高，反应较为迅速，约5分钟已经反应完全。

注3：如果荧光酶标仪没有温控功能，也可以在室温测定，但这样检测出来的是室温条件下的酶活性，此时酶活性可能会偏低一些，不同的酶偏低的程度会有所不同。

6. 计算：

a. 计算每个样品孔和空白对照孔的平均荧光值，可分别记录为$RFU_{空白对照}$、$RFU_{阳性对照}$和$RFU_{待测样品}$。RFU，Relative Fluorescence Unit。选取待测样品组MCA荧光强度呈线性关系的时间点的数据用于分析，记录呈线性关系的时间间隔为T，时间间隔T内的荧光强度变化量为ΔRFU，即$\Delta RFU = RFU_{待测样品(Time\ b)} - RFU_{待测样品(Time\ a)}$。

b. 也可以直接比较各个样品在一定时间内的ΔRFU而确定样品的M^{pro}/$3CL^{pro}$相对活性，但须确保最终时间点时RFU读数未达平台。

c. 也可将标准曲线各孔的荧光值减去标准品零浓度孔的荧光值，建立MCA标准曲线。将ΔRFU代入标准曲线，即可算出在反应时间内样品中MCA的生成量(记录为A)。MCA的标准曲线请参考图2A，MCA在0-1.3nmol范围内有良好的线性关系。M^{pro}/$3CL^{pro}$蛋白酶活性的计算公式如下：

M^{pro}/$3CL^{pro}$ Activity (nmol/min/ml或mU/ml)= $A \times dil / (V_{sample} \times T)$

注：V_{sample}为检测时代测样品的体积(V_{sample}=10μl=0.01ml)

dil为步骤4中稀释倍数

T为步骤6a中反应时间(min)

A为步骤6c中根据标准曲线计算得的MCA产物量(nmol)

酶活力单位U (Unit)的定义为：在pH7.0，温度37ºC条件下，每分钟催化生成1μmol MCA-AVLQ的酶量定义为一个单位。本试剂盒中提供的2019-nCoV M^{pro}/$3CL^{pro}$的酶活力≥300U/g (即≥300μmol/min/g)。

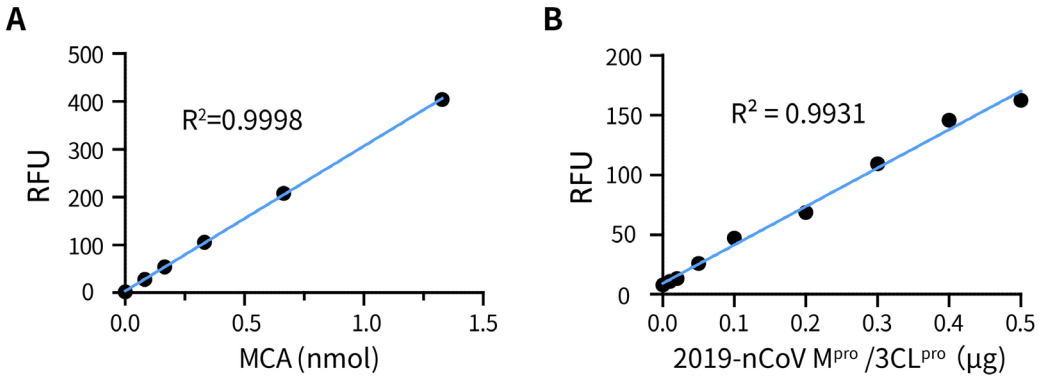

图2. 碧云天冠状病毒M^{pro}/$3CL^{pro}$活性荧光检测试剂盒的MCA标准曲线和2019-nCoV M^{pro}/$3CL^{pro}$阳性对照检测效果图。本试剂盒的MCA标准品的标准曲线示意图见图A。不同量的2019-nCoV M^{pro}/$3CL^{pro}$酶切底物生成产物的荧光强度示意图见图B。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
D8006S	新型冠状病毒(2019-nCoV)双荧光qRT-PCR试剂盒	100次
D8006M	新型冠状病毒(2019-nCoV)双荧光qRT-PCR试剂盒	500次
P0312S	新型冠状病毒M^{pro}/$3CL^{pro}$抑制剂筛选试剂盒	100次
P0312M	新型冠状病毒M^{pro}/$3CL^{pro}$抑制剂筛选试剂盒	500次
P9731-0.1ml	MCA-AVLQSGFR-Lys(Dnp)-Lys-NH_2 (冠状病毒主蛋白酶荧光底物)	20mM×0.1ml
P9731-5mg	MCA-AVLQSGFR-Lys(Dnp)-Lys-NH_2 (冠状病毒主蛋白酶荧光底物)	5mg
P9731-25mg	MCA-AVLQSGFR-Lys(Dnp)-Lys-NH_2 (冠状病毒主蛋白酶荧光底物)	25mg
P9733-0.1ml	Dabcyl-KTSAVLQSGFRKME-Edans	20mM×0.1ml

	(冠状病毒主蛋白酶荧光底物)	
P9733-5mg	Dabcyl-KTSAVLQSGFRKME-Edans (冠状病毒主蛋白酶荧光底物)	5mg
P9733-25mg	Dabcyl-KTSAVLQSGFRKME-Edans (冠状病毒蛋主白酶荧光底物)	25mg
R0011	Beyozol (总RNA抽提试剂)	100ml
R0016	Trizol (总RNA抽提试剂)	100ml
R0021	DEPC水(DNase、RNase free)	100ml
R0022	DEPC水(DNase、RNase free)	500ml
R0035S	RNAeasy™病毒RNA抽提试剂盒(离心柱式)	12次
R0035M	RNAeasy™病毒RNA抽提试剂盒(离心柱式)	50次
R0035L	RNAeasy™病毒RNA抽提试剂盒(离心柱式)	200次
R0036-200μg	Carrier RNA	200μg
R0036-1mg	Carrier RNA	1mg
R0123	RNase and DNase Away	250ml
R0125	RNase, DNase and DNA Away	250ml
R0127	RNase, DNase, RNA and DNA Away	250ml
R0141-100ml	RNALater™病毒RNA稳定保存液	100ml
R0141-500ml	RNALater™病毒RNA稳定保存液	500ml
R0143-100ml	病毒样品常规保存液	100ml
R0143-500ml	病毒样品常规保存液	500ml
R0145-100ml	BeyoDirect™ RNA病毒直接qRT-PCR保存液	100ml
R0145-500ml	BeyoDirect™ RNA病毒直接qRT-PCR保存液	500ml
FSF002	荧光定量PCR用封板膜(ABI分装)	10片
FTUB333	荧光定量PCR用96孔板(ABI原装)	10个
FTUB384	荧光定量PCR用384孔板(ABI分装)	10个

Version 2022.10.18