

# 中文说明书

# MTase-Glo™

# Methyltransferase Assay

适用产品目录号：  
V7601 和 V7602



# MTase-Glo™ Methyltransferase Assay

所有技术文献的英文原版均可在 [www.promega.com/protocols](http://www.promega.com/protocols) 获得。请访问该网址以确定您使用的说明书是否为最新版本。  
如果您在使用该试剂盒时有任何问题，请与 Promega 北京技术服务部联系。  
电子邮箱：[chinatechserv@promega.com](mailto:chinatechserv@promega.com)

1. 描述 .....	1
2. 产品组分及储存条件.....	4
3. 开始实验前 .....	4
3.A MTase-Glo™ 甲基转移酶测定的规模调整 .....	4
3.B 反应缓冲液与 SAH 溶液的配制 .....	5
3.C 为 SAH 标准曲线准备标准品 .....	5
3.D 生成与使用 SAH 标准曲线 .....	6
4. MTase-Glo™ 甲基转移酶测定操作方案.....	7
4.A 确定最适酶浓度.....	7
4.B 确定甲基转移酶底物的 Km 值 .....	12
4.C 确定 IC <sub>50</sub> 值 .....	18
4.D 确定 Z' 因子 .....	22
5. 缓冲液和溶液的组成.....	25
6. 疑难解答 .....	26
7. 参考文献 .....	28
8. 相关产品 .....	28
9. 更改总结 .....	29

## 1. 描述

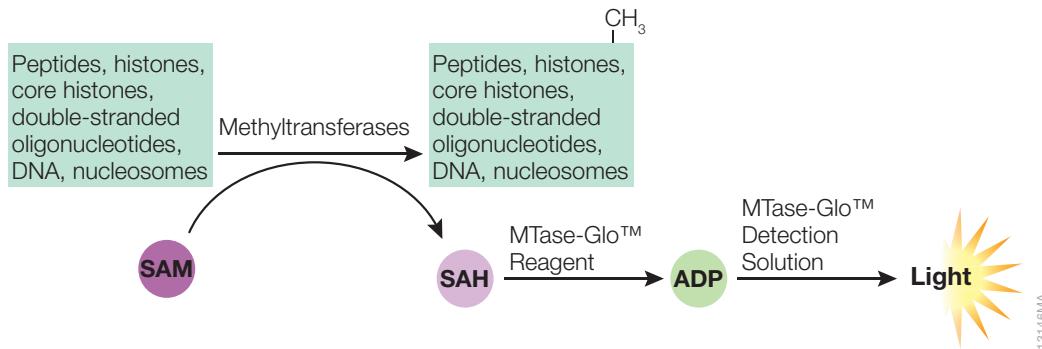
蛋白质和核酸的翻译后修饰、转录后修饰和表观遗传修饰在影响细胞命运方面起着重要作用。催化磷酸化、乙酰化和甲基化等修饰的酶已被确定为药物靶点，近期的生化和生物学数据显示，其中一些酶活性在癌症、炎症和神经退行性疾病中具有致病作用（1-5）。在这些酶中，甲基转移酶通过改变表观基因组并调控核酸和蛋白质的甲基化状态，从而影响细胞功能和生理。因此，在药物发现应用中，测试小分子以识别甲基转移酶激活剂或抑制剂时，拥有一个敏感且通用的甲基转移酶测定方法是十分有益的。

## 1. 描述（续）

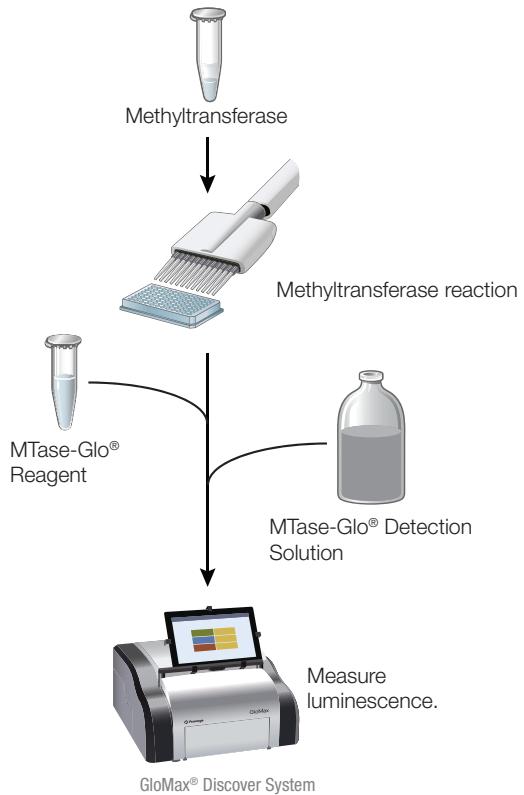
MTase-Glo™ Assay<sup>(a,b)</sup> 是一种基于生物发光的测定方法，适用于高通量筛选应用中监测甲基转移酶（methyltransferases, MTases）的活性及其受小分子调节的情况。该测定通过监测反应产物 S- 腺苷同型半胱氨酸（S-adenosyl homocysteine, SAH）的形成，能够检测到广泛范围的甲基转移酶活性的变化，包括 DNA、蛋白质、RNA 和小分子甲基转移酶。MTase-Glo™ Assay 可用于所有类别的蛋白质甲基转移酶（赖氨酸和精氨酸）以及不同类型的底物（肽、大蛋白乃至核小体），以确定这些酶的特异性和底物需求。

MTase-Glo™ 甲基转移酶测定表现出高信号背景比，低变异系数，强稳定性 ( $Z'$  值 >0.7)，并且兼容 96 孔、384 孔及 1536 孔板格式。该测定能与广泛的底物一起使用，生成动力学数据，并确定各种甲基转移酶调节剂的作用机制，且不受高底物浓度或底物类型（短肽与长肽）的影响。

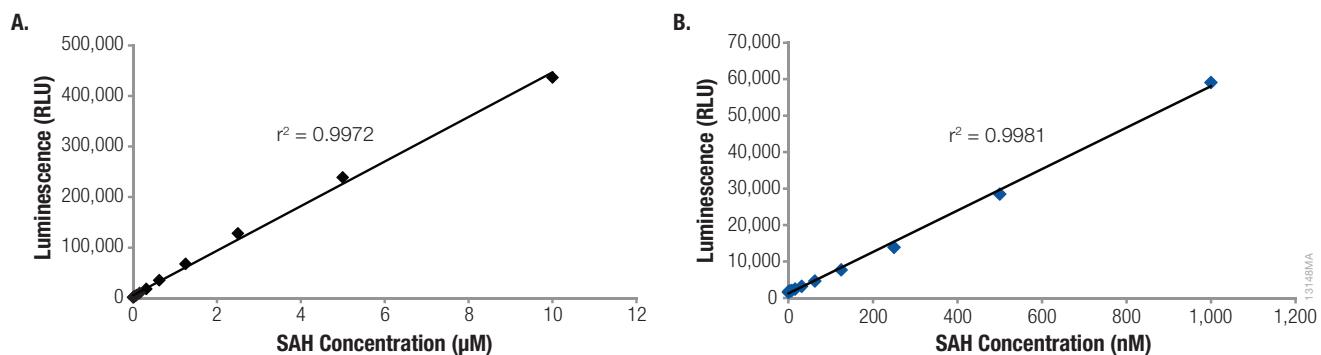
甲基转移酶反应完成后，加入 MTase-Glo™ Reagent 将 SAH 转化为 ADP。随后添加 MTase-Glo™ Detection Solution 将 ADP 转化为 ATP，通过萤光素酶反应进行检测（图 1）。利用平板读取式发光仪测量发光强度（图 2），并通过 SAH 标准曲线将发光强度与 SAH 浓度相关联（图 3）。发光信号的半衰期超过 4 小时。这种延长的信号半衰期消除了对带有注射器的发光仪的需求，允许批量处理多个平板。



**图 1. MTase-Glo™ Methyltransferase Assay 示意图。**底物可以是肽、组蛋白、核心组蛋白（例如 H3 或 H4）、双链 DNA 寡核苷酸、DNA 或核小体。



**图 2. MTase-Glo™ 甲基转移酶测定流程。**



**图 3. MTase-Glo™ Assay 代表性 SAH 标准曲线。**向低体积 384 孔板中分配  $4\mu\text{l}$  指定浓度的纯化 SAH。按照第 4.A 节所述执行 MTase-Glo™ Assay，并使用平板读取式发光仪测量发光值。

## 2. 产品组分和储存条件

产品	规格	目录号
<b>MTase-Glo™ Methyltransferase Assay</b>	<b>400 assays</b>	<b>V7601</b>

该系统提供足够用于 96 孔板中 400 次检测或低容量 384 孔板中 2000 次检测的试剂 \*，包括：

- 300  $\mu$ l SAH, 15 $\mu$ M
- 200  $\mu$ l SAM, 1mM
- 1 ml MTase-Glo™ Reagent, 10X
- 10 ml MTase-Glo™ Detection Solution

产品	规格	目录号
<b>MTase-Glo™ Methyltransferase Assay</b>	<b>2,000 assays</b>	<b>V7602</b>

该系统提供足够用于 96 孔板中 2000 次检测或低容量 384 孔板中 10000 次检测的试剂 \*，包括：

- 300  $\mu$ l SAH, 15 $\mu$ M
- 1 ml SAM, 1mM
- 5 ml MTase-Glo™ Reagent, 10X
- 50 ml MTase-Glo™ Detection Solution

\* “4.B 确定甲基转移酶底物的  $K_m$  值”部分描述的检测方案采用比常规检测更大的检测体积，不满足此处描述的检测次数。

**储存条件：**将 MTase-Glo™ Methyltransferase Assay 存放在 -65°C 以下。使用前，请将所有组分在室温下完全解冻，除了 10X MTase-Glo™ Reagent，该试剂需在冰上解冻。使用前彻底混合已解冻的试剂，但避免剧烈振荡 (do not vortex)。将解冻的 10X MTase-Glo™ Reagent 置于冰上直至使用。首次使用后，将 10X MTase-Glo™ Reagent 分装成一次性用量的小份，并储存在 -65°C 以下。在即将使用前才配制 MTase-Glo™ Reagent 的工作稀释液，并仅为每次实验准备足够的量；勿冷冻稀释后的试剂。首次使用后，将解冻的 MTase-Glo™ Detection Solution 分装成一次性用量的小份，并储存在 -30°C 至 -10°C。请查看产品标签上的有效日期。

## 3. 开始实验前

### 3.A MTase-Glo™ 甲基转移酶测定的规模调整

MTase-Glo™ Methyltransferase Assay 可使用多种板型进行。本手册中的实验步骤提供了针对 96 孔板、半区 96 孔板、384 孔板、低体积 384 孔板及 1536 孔板每孔的推荐体积。



**注意：**您可以使用其他体积，但务必按比例调整相应试剂的体积。

### 3.B. 反应缓冲液与 SAH 溶液的配制

根据实验需要，增减下方提供的成分体积以制备您所需体积的 1X 反应缓冲液和 1 $\mu$ M SAH 溶液。4X 反应缓冲液的组成在第 5 部分提供。

#### 1X Reaction Buffer

成分	体积
NANOpure® water ( 或同等纯度的水 )	750 $\mu$ l
4X reaction buffer	250 $\mu$ l
总体积	1ml

#### 1 $\mu$ M SAH Solution

成分	体积
NANOpure® water ( 或同等纯度的水 )	136.7 $\mu$ l
15 $\mu$ M SAH	13.3 $\mu$ l
4X reaction buffer	50 $\mu$ l
总体积	0.2ml

### 3.C. 为 SAH 标准曲线准备标准品

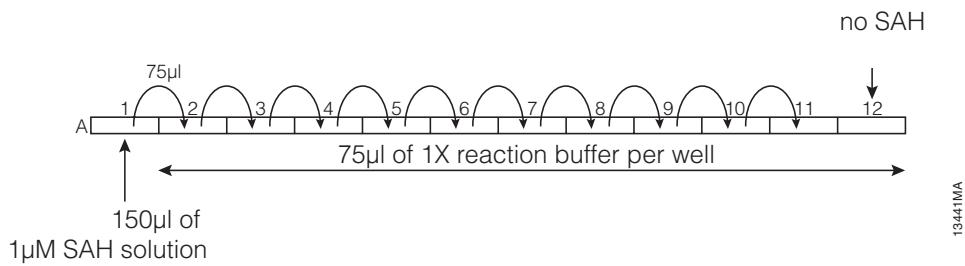
为了将发光值与 SAH 浓度相关联，需使用 SAH 的系列稀释液制作标准曲线。本操作方案说明如何制备一个从 0 $\mu$ M 至 1 $\mu$ M 范围的 SAH 标准曲线。代表性 SAH 标准曲线见图 3。如有需要，您也可以准备一个从 0 $\mu$ M 至 10 $\mu$ M 范围的标准曲线。使用 SAH 标准曲线是可选的。

**注意：**我们建议至少包含一个在 0 $\mu$ M 至 0.5 $\mu$ M SAH 范围内的标准品，以评估发光仪的灵敏度。确保您的发光仪能够测量由 0.5 $\mu$ M SAH 产生的净发光信号（即，超过背景的发光变化）。

在进行 MTase-Glo™ Methyltransferase Assay 之前，在一个单独的 96 孔板中准备好 SAH 标准品，并将这些标准品转移到 MTase-Glo 测定板上预留用于 SAH 标准曲线的孔中（如第 4 部分所述）。每个浓度的 SAH 标准品需设置三个重复孔。每次进行 MTase-Glo™ 测定时，都应新鲜配制 SAH 标准品。

1. 向 96 孔板的 A2 至 A12 孔中各加入 75 $\mu$ l 的 1X 反应缓冲液。
2. 将第 3.B 部分准备好的 1 $\mu$ M SAH 溶液取 150 $\mu$ l 加入到 A1 孔中。
3. 执行两倍系列稀释：从 A1 孔移取 75 $\mu$ l 加入到 A2 孔中，混匀。再从 A2 孔移取 75 $\mu$ l 加入到 A3 孔中，并混匀。对于 A3 至 A11 孔重复此转移步骤，每次转移后充分混匀。丢弃从 A11 孔中转移出的 75 $\mu$ l 液体。A12 孔不加入 SAH 溶液。参见图 4。
4. 将 SAH 标准品在室温下保存，直到准备使用。请在配制后 2 小时之内使用。

### 3.C. 为 SAH 标准曲线准备标准品（续）



**图 4. SAH 标准品的稀释方案。**

### 3.D 生成与使用 SAH 标准曲线

MTase-Glo™ Methyltransferase Assay 产生的发光信号与 SAH 浓度成正比。为了将发光值与 SAH 浓度相关联，您必须使用原始发光值（即，未扣除背景的发光值）或净发光值（即，扣除背景后的发光值）来生成 SAH 标准曲线。利用 SAH 标准品的发光值（以相对光单位，RLU 表示），通过绘制发光值（Y 轴）相对 SAH 浓度（X 轴）的图表来生成标准曲线，并使用如 Microsoft Excel® 之类的图表软件生成线性回归图。运用线性方程计算样品的 SAH 浓度。或者，计算 SAH 标准品和样品相对于背景的发光变化（净 RLU），并使用这些扣除背景后的发光值来生成标准曲线并确定 SAH 浓度。

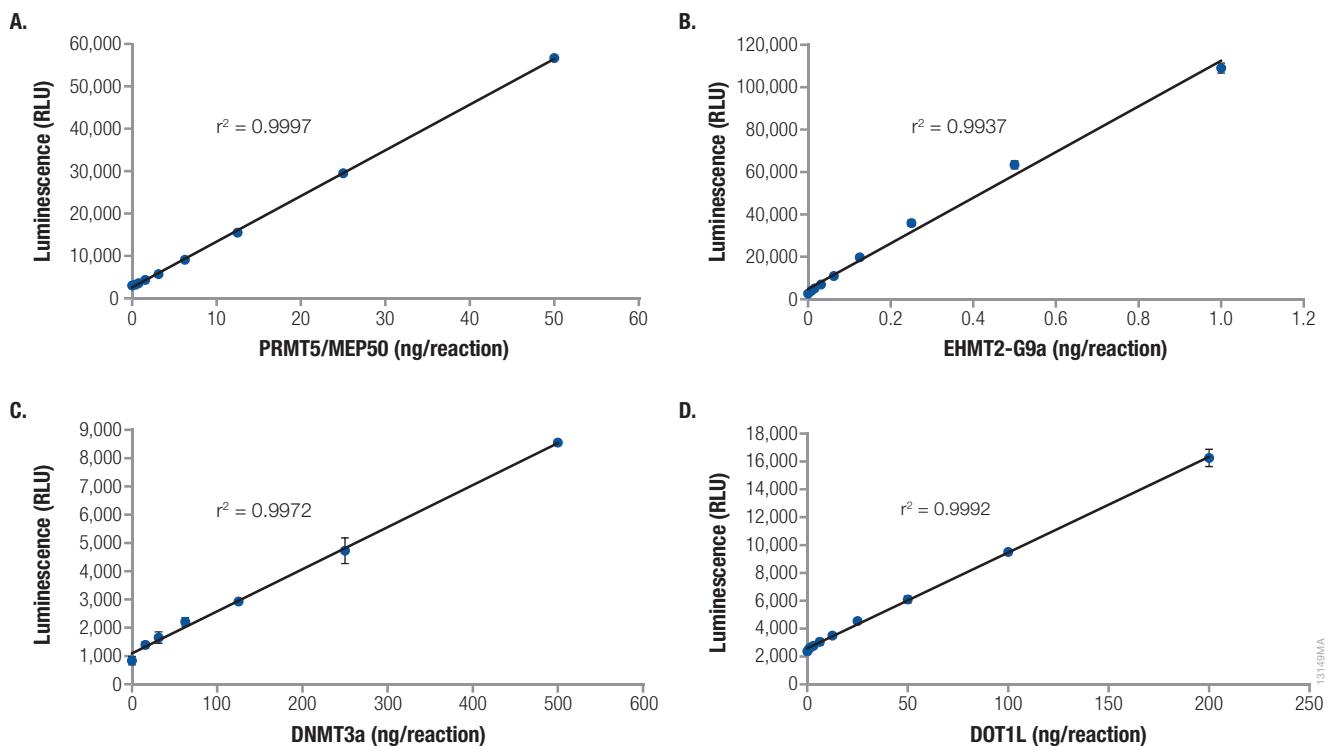
对于每个标准品：净 RLU = 标准品的 RLU - 0 $\mu$ M SAH 标准品的 RLU

对于每个样品：净 RLU = 含酶反应的 RLU - 无酶反应的 RLU

#### 4. MTase-Glo™ 甲基转移酶测定操作方案

##### 4.A. 确定最适酶浓度

这个操作方案允许您使用一系列适当的甲基转移酶底物（如肽、全长组蛋白和核小体）来确定在 MTase-Glo™ 检测中使用的甲基转移酶的最佳量（通常称为酶的 EC<sub>50</sub> 值）。或者，您可以调整此方案以定量酶活性。该操作方案基于低体积 384 孔板开发；同时提供了适用于其他板型的体积调整建议。图 5 展示了不同类别甲基转移酶滴定的代表性数据。



**图 5. 利用 MTase-Glo™ Assay 对甲基转移酶进行滴定。**PRMT5/MEP50 (图 A)、EHMT2-G9a (图 B)、DNMT3a (图 C) 或 DOT1/L (图 D) 在不透光白色低体积 384 孔板中，按照指示浓度在 1X 反应缓冲液中进行测定。遵循第 4.A 节中描述的 MTase-Glo™ Assay 实验流程。每个数据点代表两个复孔的平均值；误差条表示标准偏差。数据分析使用 Excel® 软件完成。PRMT5/MEP50、EHMT2-G9a 和 DOT1/L 购自 BPS Bioscience, Inc. (美国加州圣地亚哥)，而 DNMT3a 则从 Reaction Biology Corp (美国宾州马尔文) 购买。

#### 4.A. 确定最适酶浓度 (续)

##### 用户需提供的材料

(溶液成分见第 5 节。)

- 4X 反应缓冲液
- 待研究的甲基转移酶
- 除 S- 腺苷 -L- 蛋氨酸 (SAM) 以外的感兴趣的甲基转移酶底物
- 完全不透光的白色 96 孔板、384 孔板、低体积 384 孔板或 1536 孔板 (不要使用黑色或透明板。)
- 用于酶稀释的 96 孔板
- 多通道移液器或自动移液工作站
- 与测定板兼容的台式离心机
- 微孔板用摇床
- NANOpure® 超纯水或等同纯度的水
- 平板读数式发光仪

**注意:** 如有需要, 根据第 3.C 和 3.D 节所述, 通过 SAH 的系列稀释液来生成 SAH 标准曲线, 以关联发光值和 SAH 浓度。请确保在测定板上预留孔位或使用单独的板来进行 SAH 标准品的测定。

每个孔所需的反应组分体积如下:

反应组分	用于 96 孔板所需体积	用于半区 96 孔板或 384 孔板所需体积	用于低体积 384 孔板或 1536 孔板所需体积
甲基转移酶反应, 包括: 酶, 底物, 和任何测试化合物	20μl	8μl	4μl
制备好的 5X MTase-Glo™ Reagent	5μl	2μl	1μl
MTase-Glo™ Detection Solution	25μl	10μl	5μl

## 准备

- 计算实验所需的 1X 反应缓冲液、4X 反应缓冲液、5X MTase-Glo™ Reagent 和 MTase-Glo™ Detection Solution 的体积。按照第 3.B 节描述的方法制备 1X 反应缓冲液。将 1X 和 4X 反应缓冲液以及 MTase-Glo™ Detection Solution 平衡至室温。5X MTase-Glo™ Reagent 将在步骤 9 中制备。
- SAH 标准品（可选）：**按照第 3.C 节所述，为 SAH 标准曲线准备 SAH 标准样品。
- 按以下步骤使用 1X 反应缓冲液配制含有 20μM SAM 的 2X 浓度底物：

组分	体积	最终浓度
NANOPure® water	加入后使整个体系终体积为 1ml	
4X reaction buffer	250μl	1X
1mM SAM	20μl	20μM
甲基转移酶底物	__μl	2X

**注意：**在甲基转移酶反应中的最终 SAM 浓度为 10μM（因为此处准备的是 2 倍浓度的反应混合物）。您也可以通过使用含有 2μM SAM 的 2X 底物（即每 1ml 的 2X 底物加入 2μl 的 1mM SAM），在最终 1μM SAM 浓度下进行测定。若要使用不同最终浓度的 SAM，请相应调整准备 2X 浓度底物时使用的 1mM SAM 的体积。

- 在 1X 反应缓冲液中制备 100μl 所需浓度的甲基转移酶。
- 在一个独立的 96 孔板中，按以下步骤使用 1X 反应缓冲液对甲基转移酶进行两倍系列稀释：
  - 向 96 孔板的 A2 到 A12 孔中各加入 50μl 的 1X 反应缓冲液。
  - 将步骤 3 中准备的 100μl 酶液加入到 A1 孔中。
  - 通过从 A1 孔转移 50μl 酶液到 A2 孔并混匀来进行酶的两倍系列稀释。再从 A2 孔转移 50μl 到 A3 孔；充分混匀。对 A3 到 A11 孔重复此操作。丢弃从 A11 孔转移出的 50μl 液体。不要向 A12 孔添加酶。参见图 6。

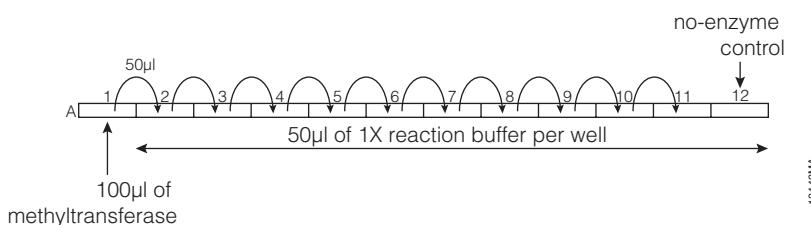


图 6. 甲基转移酶的稀释方案。

#### 4.A. 确定最适酶浓度 (续)

5. **SAH 标准品 (可选) :** 将第 3.C 节中准备的 96 孔板中各个 SAH 标准品转移如下所示体积到为 SAH 标准曲线预留的孔中。

用于 96 孔板所需体积	用于半区 96 孔板或 384 孔板所需体积	用于低体积 384 孔板或 1536 孔板所需体积
20μl	8μl	4μl

#### 检测流程

6. 向测定板的每个孔中加入如下所示体积的步骤 2 中准备的 2X 底物。

用于 96 孔板所需体积	用于半区 96 孔板或 384 孔板所需体积	用于低体积 384 孔板或 1536 孔板所需体积
10μl	4μl	2μl

7. 通过将步骤 4 中 96 孔板中准备的酶梯度稀释液转移如下所示体积到测定板中，启动甲基转移酶反应。将来自 A1 孔的酶转移到第 1 列的所有孔中，来自 A2 孔的酶转移到第 2 列的所有孔中，以此类推。

用于 96 孔板所需体积	用于半区 96 孔板或 384 孔板所需体积	用于低体积 384 孔板或 1536 孔板所需体积
10μl	4μl	2μl

**注意：**第 12 列的测定为无酶对照反应。

8. 使用台式离心机以 1000rpm 离心 1-2 分钟，确保试剂位于孔底。通过摇动 1-2 分钟混合板。在室温（23°C）或所希望的反应温度下孵育板，持续所希望的反应时间。

**注意：**在板孵育期间，将 10X MTase-Glo™ Reagent 在冰上解冻，直到第 9 步准备使用。

9. 使用前彻底混匀解冻的 MTase-Glo™ Reagent。根据步骤 10 所需，通过增减下方提供的成分体积来配制所需体积的 5X MTase-Glo™ Reagent。轻轻颠倒混匀；避免剧烈振荡。使用前，使 5X MTase-Glo™ Reagent 平衡到室温。

成分	体积
MTase-Glo™ Reagent, 10X	250μl
NANOPure® water ( 或同等纯度的水 )	250μl
总体积	500μl

**注意：**

- 在使用前立即配制 5X MTase-Glo™ Reagent，并仅配制当次实验所需量。不要冷冻保存未用完的 5X MTase-Glo™ Reagent。
- 使用后，将剩余的 10X MTase-Glo™ Reagent 分装成单次使用剂量的小份，并储存在 -65°C 以下。

10. 一旦甲基转移酶反应完成，向所有孔中加入如下所示体积的步骤 9 中准备的室温 5X MTase-Glo™ Reagent。使用台式离心机以 1000rpm 离心 1-2 分钟，确保试剂沉降至孔底。摇动板子 1-2 分钟进行混匀，并在室温下孵育 30 分钟。

用于 96 孔板所需体积	用于半区 96 孔板或 384 孔板所需体积	用于低体积 384 孔板或 1536 孔板所需体积
5μl	2μl	1μl

11. 向所有孔中加入如下所示体积的室温 MTase-Glo™ Detection Solution。使用台式离心机以 1000rpm 离心 1-2 分钟，确保试剂沉淀在孔底部。摇动板子 1-2 分钟混匀，并在室温下孵育 30 分钟。

用于 96 孔板所需体积	用于半区 96 孔板或 384 孔板所需体积	用于低体积 384 孔板或 1536 孔板所需体积
25μl	10μl	5μl

**注意：** 使用后，将剩余的 MTase-Glo™ Detection Solution 分装成单次使用分量的等份，并储存在 -30°C 至 -10°C。

12. 使用平板读数式发光仪测量发光值。

通过 GraphPad Prism® 或类似软件，将发光值（Y 轴）与酶浓度（X 轴）对应关系绘制成图，从而确定后续实验中的最适酶浓度。

**注意：** 最适酶浓度应产生远高于背景且处于检测线性范围内的发光值。

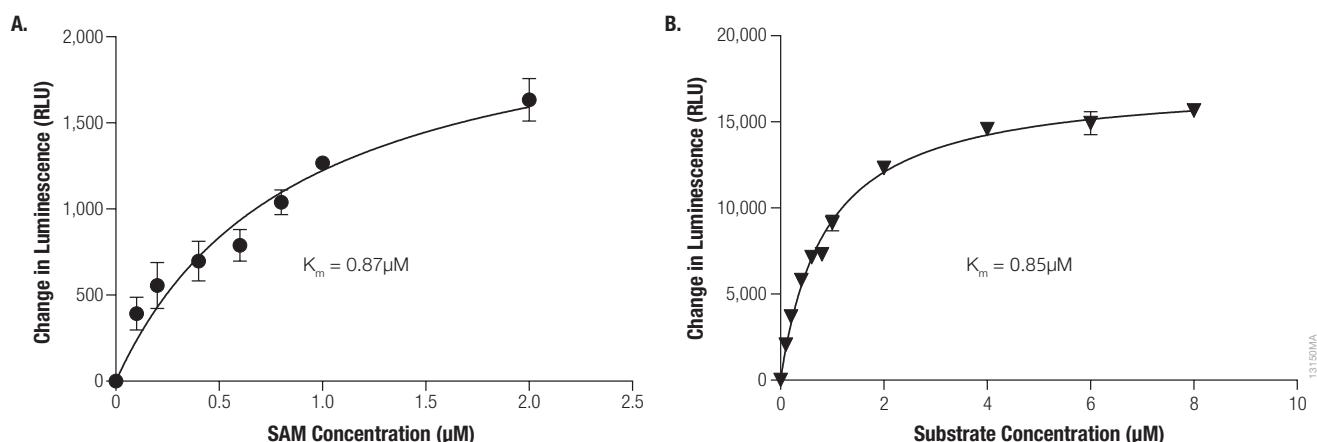
#### 4.B. 确定甲基转移酶底物的 $K_m$ 值

这个操作方案允许您在固定浓度的 SAM 存在下确定潜在甲基转移酶底物的  $K_m$  值。或者，您也可以在固定浓度的底物（如来自组蛋白 3 (H3) 的肽）存在下确定 SAM 的  $K_m$  值。

在测定  $K_m$  值时，使用 0.5% TFA (三氟乙酸) 在加入 MTase-Glo™ Reagent 前终止反应。

这里提供的示例操作方案使用 SAM 和 H3 衍生肽 (1-25) 作为常染色质组蛋白赖氨酸 N- 甲基转移酶 2 (EHMT2-G9a) 的底物。对于其他底物，可能需要优化底物浓度和其他测定条件。使用这个操作方案，计算得到的 SAM 的  $K_m$  值为  $0.87\mu\text{M}$ ，H3 衍生肽 (1-25) 的  $K_m$  值为  $0.85\mu\text{M}$ ；这些值与已发表的  $K_m$  值相近 (3)。代表性结果见图 7。

**注意：**如需，可按照第 3.C 和 3.D 节所述，利用 SAH 的系列稀释液来生成 SAH 标准曲线，以关联发光值和 SAH 浓度。请确保在测定板上或单独的板上预留孔位用于 SAH 标准品。



**图 7. 确定 SAM 及 H3 衍生肽 (1-25) 对 EHMT2-G9a 的  $K_m$  值。**图 A：在固体白色低体积 384 孔板的孔中装配反应体系，包含 1ng EHMT2-G9a 酶、20 $\mu\text{M}$  H3 衍生肽 (1-25) 以及所示浓度的 SAM，在室温 (23°C) 下孵育 5 分钟。图 B：在固体白色低体积 384 孔板的孔中装配反应体系，包含 1ng EHMT2-G9a 酶、20 $\mu\text{M}$  SAM 以及所示浓度的 H3 衍生肽 (1-25)，并在室温下孵育 20 分钟。对于这两组反应，均按照 4.B 节所述执行 MTase-Glo™ 检测。每个数据点代表三次重复实验的平均值；误差条表示标准偏差。数据分析采用针对 Windows® 操作系统的 GraphPad Prism® 软件，版本 4.02，应用了 S 型剂量反应 (可变斜率) 方程。EHMT2-G9a 来源于 BPS Bioscience, Inc. (圣地亚哥，加利福尼亚州)。

## 用户需提供的材料

(溶液成分见第 5 节。)

- 4X 反应缓冲液
- 感兴趣的甲基转移酶
- 感兴趣的甲基转移酶底物，如源自组蛋白 3 的肽段 (1-25)
- 完全不透光白色 96 孔板、384 孔板、低体积 384 孔板或 1536 孔板（不要使用黑色或透明板）
- 用于底物稀释的 96 孔板
- 多通道移液器或自动化移液工作站
- NANOpure® 超纯水或等效纯度的水
- 含有 0.5% 三氟乙酸的 NANOpure® 水
- 与测定板兼容的台式离心机
- 微孔板用摇床
- 平板读数式发光仪

每个孔所需的反应组分体积如下：

反应组分	用于 96 孔板所需体积	用于半区 96 孔板或 384 孔板所需体积	用于低体积 384 孔板或 1536 孔板所需体积
甲基转移酶反应，包括：酶，底物，和任何测试化合物	20μl	8μl	4μl
0.5% TFA	5μl	2μl	1μl
制备好的 6X MTase-Glo™ Reagent	5μl	2μl	1μl
MTase-Glo™ Detection Solution	30μl	12μl	6μl

**注意：**在此操作方案中，MTase-Glo™ Reagent 以 6X 浓度使用，以补偿反应中使用的 TFA 体积，并确保最终反应中 MTase-Glo™ Reagent 的浓度为 1X。

## 准备

1. 计算实验所需的 1X 反应缓冲液、4X 反应缓冲液、6X MTase-Glo™ Reagent 和 MTase-Glo™ Detection Solution 的体积。按照第 3.B 节所述制备 1X 反应缓冲液。将 1X 和 4X 反应缓冲液及 MTase-Glo™ Detection Solution 平衡至室温。6X MTase-Glo™ Reagent 将在步骤 9 中配制。

**SAH 标准品（可选）：**按照第 3.C 节所述，为 SAH 标准曲线准备 SAH 标准样品。

#### 4.B. 确定甲基转移酶底物的 $K_m$ 值 (续)

2. 根据实验设计，准备适当的底物稀释液，操作如下：

若要在甲基转移酶反应中使用恒定浓度的 SAM 和变化浓度的目标底物，比如 H3 衍生肽 (1-25)，则应准备含有 40 $\mu$ M SAM 的底物稀释液 A。

##### Substrate Dilution Solution A

组分	体积
NANOPure® water	710 $\mu$ l
4X reaction buffer	250 $\mu$ l
1mM SAM	40 $\mu$ l
总体积	1.0ml

若要在甲基转移酶反应中使用恒定浓度的 H3 衍生肽 (1-25) 和变化浓度的 SAM，则应准备含有 40 $\mu$ M H3 衍生肽 (1-25) 的底物稀释液 B。

##### Substrate Dilution Solution B

组分	体积
NANOPure® water	710 $\mu$ l
4X reaction buffer	250 $\mu$ l
1mM H3-derived peptide (1-25)	40 $\mu$ l
Total volume	1.0ml

3. 将酶在 1X 反应缓冲液中稀释至所需最终浓度的两倍 (2X)。  
 4. 按以下方法准备适当的 2X 底物溶液：

若要使用恒定浓度的 SAM 和变化浓度的 H3 衍生肽 (1-25)，请准备 2X 底物溶液 A。

##### 2X Substrate Solution A

组分	体积	终浓度
NANOPure® water	103.5 $\mu$ l	
4X reaction buffer	37.5 $\mu$ l	1X
1mM H3-derived peptide (1-25)	3.0 $\mu$ l	20 $\mu$ M
1mM SAM	6.0 $\mu$ l	40 $\mu$ M
总体积	150 $\mu$ l	

若需在实验中使用恒定浓度的 H3 衍生肽 (1-25) 及不同浓度的 SAM，应配制 2X 底物溶液 B。

### 2X Substrate Solution B

组分	体积	终浓度
NANOPure® water	103.5μl	
4X reaction buffer	37.5μl	1X
1mM SAM	1.5μl	10μM
1mM H3-derived peptide (1-25)	6.0μl	40μM
总体积	150μl	

充分混匀 2X 底物溶液。

- 在另一个独立的 96 孔板中，按照以下步骤，对步骤 4 中配制的 2X 底物溶液进行两倍系列稀释。使用步骤 2 中准备的底物稀释缓冲液 A 来稀释 2X 底物溶液 A，而用底物稀释缓冲液 B 来稀释 2X 底物溶液 B。
  - 向 96 孔板的 A2 至 A12 孔中各加入 50μl 在步骤 2 中准备的底物稀释缓冲液。
  - 将步骤 4 中准备的 100μl 2X 底物溶液加入到 A1 孔中。
  - 通过从 A1 孔向 A2 孔转移 50μl 溶液并混匀来进行 2X 底物溶液的两倍稀释。再从 A2 孔转移 50μl 到 A3 孔。对 A3 至 A11 孔重复此操作。从 A11 孔丢弃 50μl 液体。不要在 A12 孔（无底物对照反应）中添加底物溶液。参见图 8。

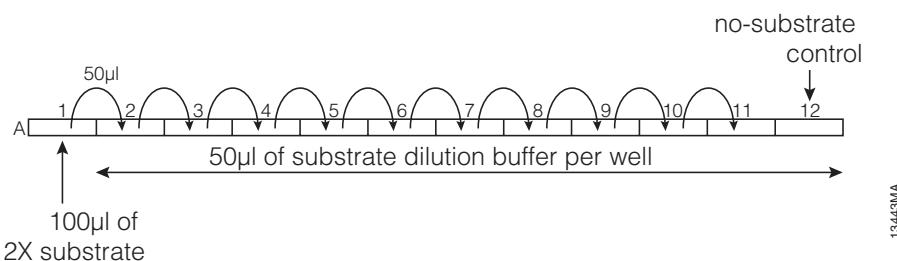


图 8. 底物的稀释方案。

- SAH 标准品（可选）：**将第 3.C 节中准备的 96 孔板中各个 SAH 标准品转移如下所示体积到为 SAH 标准曲线预留的孔中。

用于 96 孔板所需体积	用于半区 96 孔板或 384 孔板所需体积	用于低体积 384 孔板 或 1536 孔板所需体积
20μl	8μl	4μl

#### 4.B. 确定甲基转移酶底物的 $K_m$ 值 (续)

##### 检测流程

- 向固体白色测定板的每个孔中加入如下所示体积的步骤 5 中准备的 2X 底物溶液。将来自 A1 孔的底物转移到第 1 列的所有孔中，来自 A2 孔的底物转移到第 2 列的所有孔中，依此类推。

用于 96 孔板所需体积	用于半区 96 孔板或 384 孔板所需体积	用于低体积 384 孔板或 1536 孔板所需体积
10μl	4μl	2μl

注意：第 12 列的测定为无底物对照反应。

- 通过向测定板的每个孔中加入如下所示体积的酶来启动甲基转移酶反应。使用台式离心机以 1000rpm 离心 1-2 分钟，确保试剂位于孔底。充分混匀，并在所希望的反应温度下孵育所设定的反应时间。

用于 96 孔板所需体积	用于半区 96 孔板或 384 孔板所需体积	用于低体积 384 孔板或 1536 孔板所需体积
10μl	4μl	2μl

注意：在孵育期间，将 10X MTase-Glo™ Reagent 在冰上解冻，直至步骤 9 中准备使用。

- 使用前彻底混匀解冻的 MTase-Glo™ Reagent。根据步骤 11 所需，通过增减下列提供的成分体积来配制所需体积的 6X MTase-Glo™ Reagent。轻轻颠倒混匀即可；避免剧烈振荡。使 6X MTase-Glo™ Reagent 平衡到室温。

组分	体积
MTase-Glo™ Reagent, 10X	312μl
NANOPure® water ( 或同等纯度的水 )	208μl
总体积	520μl

##### 注意：

- 在使用前立即配制 MTase-Glo™ Reagent，并且只配制当次实验所需的量。不要冷冻保存未用完的 6X MTase-Glo™ Reagent。
- 将剩余的 10X MTase-Glo™ Reagent 分成一次性使用剂量的等份，然后存放在 -65°C 以下。

10. 通过向每个孔中加入如下所示体积的 0.5% TFA 来终止反应。使用台式离心机以 1000rpm 离心 1-2 分钟，确保试剂沉降到孔底。充分混匀，并在室温下孵育 5 分钟。

用于 96 孔板所需体积	用于半区 96 孔板或 384 孔板所需体积	用于低体积 384 孔板或 1536 孔板所需体积
5μl	2μl	1μl

11. 向所有孔中加入如下所示体积的步骤 9 中准备的室温 6X MTase-Glo™ Reagent。使用台式离心机以 1000rpm 离心 1-2 分钟，确保试剂沉淀到孔底。摇动板子 1-2 分钟进行混匀，并在室温下孵育 30 分钟。

用于 96 孔板所需体积	用于半区 96 孔板或 384 孔板所需体积	用于低体积 384 孔板或 1536 孔板所需体积
5μl	2μl	1μl

12. 向所有孔中加入如下所示体积的室温 MTase-Glo™ Detection Solution。使用台式离心机以 1000rpm 离心 1-2 分钟，确保试剂沉降到孔底。摇晃板子 1-2 分钟混匀，并在室温下孵育 30 分钟。

用于 96 孔板所需体积	用于半区 96 孔板或 384 孔板所需体积	用于低体积 384 孔板或 1536 孔板所需体积
30μl	12μl	6μl

**注意：**使用后，将剩余的 MTase-Glo™ Detection Solution 分成一次性使用剂量的等份，并储存在 -30°C 至 -10°C。

13. 使用平板读数式发光仪测量发光值。

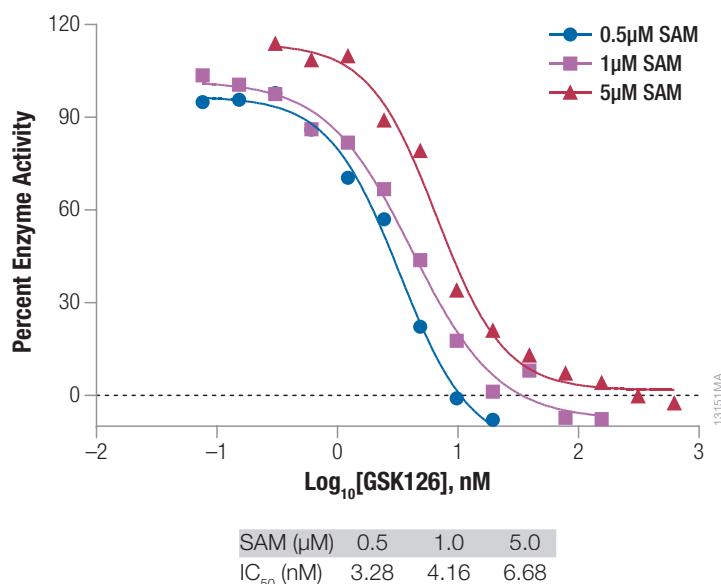
利用 GraphPad Prism® 软件或类似程序确定  $K_m$  值。

#### 4.C. 确定 IC<sub>50</sub> 值

此示例操作方案旨在确定 GSK126 对组蛋白 - 赖氨酸 N- 甲基转移酶 EZH2 酶复合体的 IC<sub>50</sub> 值。若要使用不同的酶、底物和测试化合物组合，请根据您的实验要求相应调整酶、底物和测试化合物的浓度。

MTase-Glo™ 检测不受最高达 2% 乙醇或 2% DMSO 存在的影响。

使用这个操作方案，我们确定了在 0.5μM SAM 条件下，GSK126 的 IC<sub>50</sub> 值为 3.28nM，这与已发布的 IC<sub>50</sub> 值相似（7,8）。代表性结果如图 9 所示。



**图 9. 确定 GSK126 对 EZH2 酶复合体的 IC<sub>50</sub> 值。**在固体白色低体积 384 孔板中装配反应，包含 0.5μg EZH2 酶复合体；0.5、1 或 5μM SAM；10μM 全长组蛋白 3 蛋白以及所示浓度的 GSK126，于 30°C 下孵育 60 分钟。按照第 4.C 节所述执行 MTase-Glo™ 检测。每个数据点代表三次重复的平均值；误差条表示标准偏差。数据分析使用 Excel® 软件完成。GSK126 购自 Xcess Biosciences, Inc. (美国加州圣地亚哥)。

## 用户需提供的材料

(溶液成分见第 5 节。)

- 4X 反应缓冲液
- EZH2 酶复合体或感兴趣的甲基转移酶
- 全长组蛋白 3 或感兴趣的甲基转移酶底物
- 感兴趣的甲基转移酶的已知抑制剂
- 完全不透光的白色 96 孔板、384 孔板、低体积 384 孔板或 1536 孔板（勿使用黑色或透明板）
- 用于测试化合物稀释的 96 孔板
- 多通道移液器或自动化移液工作站
- 200 $\mu$ M GSK126 或感兴趣的测试化合物的十倍最高测试浓度的储备液
- 测试化合物稀释缓冲液
- NANOpure<sup>®</sup> 超纯水或等效纯度的水
- 与测定板兼容的台式离心机
- 微孔板用摇床
- 平板读数式发光仪

**注意：**如需，可按照第 3.C 和 3.D 节所述，通过 SAH 的系列稀释来生成 SAH 标准曲线，以关联发光值和 SAH 浓度。请确保在测定板上或使用单独的板为 SAH 标准品预留孔位。

## 每个孔所需的反应组分体积如下：

反应组分	用于 96 孔板所需体积	用于半区 96 孔板或 384 孔板所需体积	用于低体积 384 孔板或 1536 孔板所需体积
甲基转移酶反应，包括：酶，底物， MTase-Glo <sup>™</sup> Reagent1 和任何测试 化合物	25 $\mu$ l	10 $\mu$ l	5 $\mu$ l
MTase-Glo <sup>™</sup> Detection Solution	25 $\mu$ l	10 $\mu$ l	5 $\mu$ l

<sup>1</sup> 该操作方案中 MTase-Glo<sup>™</sup> Reagent 被包含在甲基转移酶反应混合物中。详细信息请参见步骤 2。

## 准备

1. 计算实验所需 1X 反应缓冲液、4X 反应缓冲液、2.5 $\mu$ M SAM 及 MTase-Glo<sup>™</sup> Detection Solution 的体积。按照第 3.B 节所述制备 1X 反应缓冲液。将 1X 和 4X 反应缓冲液及 MTase-Glo<sup>™</sup> Detection Solution 平衡至室温。

**SAH 标准品（可选）：**根据第 3.C 节所述，准备用于构建 SAH 标准曲线的 SAH 标准样品。

#### 4.C. 确定 IC<sub>50</sub> 值 (续)

2. 在 1X 反应缓冲液中配制含有 25μM 全长组蛋白 3 作为底物的 EZH2 酶复合体。

组分	体积	最终浓度
EZH2 enzyme complex	μl	0.5μg 每个反应 *
full-length histone 3	μl	25μM (2.5X)
MTase-Glo™ Reagent, 10X	250μl	2.5X
4X reaction buffer	250μl	1X
NANOPure® water	加入后使整个体系终体积为 1ml	
总体积	1ml	

注意：步骤 9 中甲基转移酶反应中全长组蛋白 3 的最终浓度为 10μM。

\* 该示例如图 9 所述采用低体积 384 孔板反应格式，如果使用其他反应格式，需对酶用量进行优化。

3. 按以下方式制备适当体积的溶于 1X 反应缓冲液中的 2.5μM SAM (2.5X)：

组分	体积
1mM SAM	1.25μl
4X reaction buffer	125μl
NANOPure® water (或同等纯度的水)	373.75μl
总体积	500μl

注意：步骤 9 中甲基转移酶反应中 SAM 的最终浓度为 1μM。

4. 在 1X 反应缓冲液中制备 150μl 的 200μM GSK126 储备液，并充分混匀。进行以下两倍系列稀释：
- 向 96 孔板的 A2 至 A12 孔中各加入 50μl 测试化合物稀释缓冲液。
  - 向 A1 孔中加入 100μl 200μM GSK126。
  - 从 A1 孔向 A2 孔转移 50μl，并混匀。再向 A3 孔转移 50μl，充分混匀。对 A3 至 A11 孔重复这一操作。从 A11 孔丢弃 50μl 液体。A12 孔不加入任何 GSK126，作为无测试化合物对照。参见图 10。

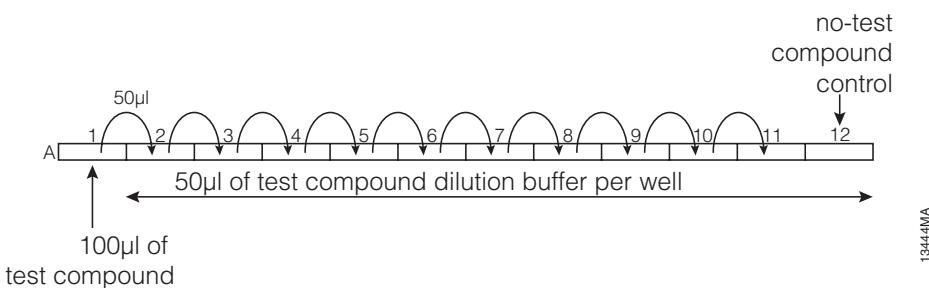


图 10. 测试化合物的稀释方案。

5. **SAH 标准品（可选）：**将第 3.C 节中准备的 96 孔板中各个 SAH 标准品转移如下所示体积到为 SAH 标准曲线预留的孔中。

用于 96 孔板所需体积	用于半区 96 孔板或 384 孔板所需体积	用于低体积 384 孔板或 1536 孔板所需体积
20μl	8μl	4μl

#### 检测流程

6. 向全白不透光的测定板的每个孔中加入如下所示体积的步骤 2 中准备的酶混合物。

用于 96 孔板所需体积	用于半区 96 孔板或 384 孔板所需体积	用于低体积 384 孔板或 1536 孔板所需体积
10μl	4μl	2μl

7. 将步骤 4 中准备的测试化合物按照如下所示体积转移到测定板的每个孔中。将 A1 孔中的测试化合物转移到第 1 列的所有孔中，A2 孔中的转移到第 2 列的所有孔中，依此类推。

用于 96 孔板所需体积	用于半区 96 孔板或 384 孔板所需体积	用于低体积 384 孔板或 1536 孔板所需体积
5μl	2μl	1μl

8. 使用台式离心机以 1000rpm 离心 1-2 分钟，确保试剂沉降到孔底。充分混匀，并在室温下孵育 5-10 分钟。

9. 通过向含有酶和测试化合物的每个孔中加入如下所示体积的步骤 3 中准备的 2.5μM SAM 来启动甲基转移酶反应。使用台式离心机以 1000rpm 离心 1-2 分钟，确保试剂沉降到孔底。摇动板子 1-2 分钟混匀。在所希望的反应温度下，孵育板子达到所希望的反应时间。

用于 96 孔板所需体积	用于半区 96 孔板或 384 孔板所需体积	用于低体积 384 孔板或 1536 孔板所需体积
10μl	4μl	2μl

10. 向所有孔中加入指定体积的室温 MTase-Glo™ Detection Solution。使用台式离心机以 1000rpm 离心 1-2 分钟，确保试剂位于孔底。摇动板子 1-2 分钟混匀，并在室温下孵育 60 分钟。

用于 96 孔板所需体积	用于半区 96 孔板或 384 孔板所需体积	用于低体积 384 孔板或 1536 孔板所需体积
25μl	10μl	5μl

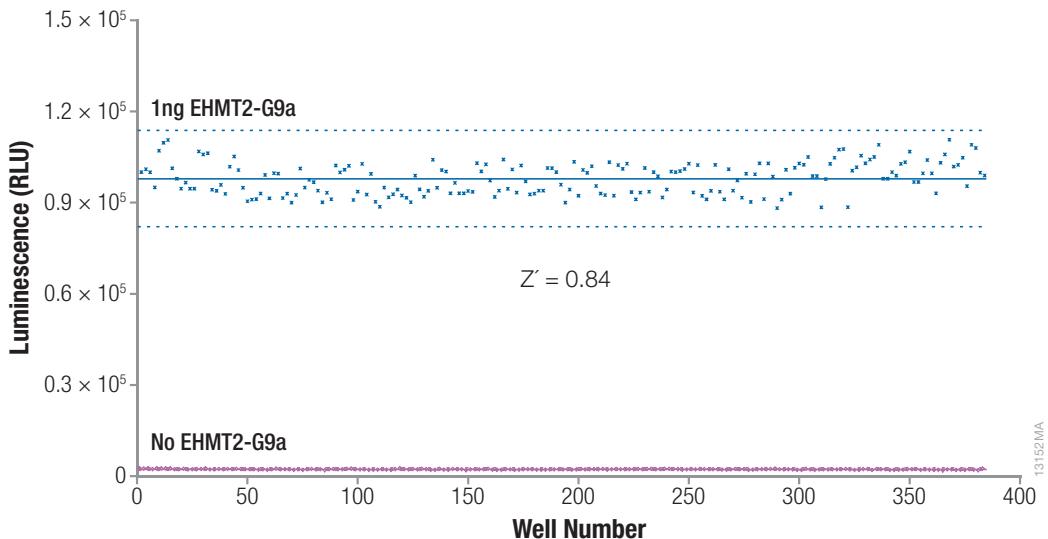
**注意：**使用后，将剩余的 MTase-Glo™ Detection Solution 分装成单次使用分量的等份，并储存在 -30°C 至 -10°C。

11. 使用平板读数式发光仪测量发光值。

利用 GraphPad Prism® 软件或类似软件确定测试化合物的 IC<sub>50</sub> 值。

#### 4.D. 确定 Z' 因子

本示例操作方案旨在利用 MTase-Glo™ Assay，在存在 15 $\mu$ M SAM 和 15 $\mu$ M H3 衍生肽（1-25）的反应体系中，确定有无 EHMT2-G9a 时的 Z' 因子（9）。可以使用其他甲基转移酶和底物，但可能需要优化检测条件。代表性数据如图 11 所示。



**图 11.** 散点图用于确定在有无 EHMT2-G9a 的情况下 MTase-Glo™ Assay 的 Z' 因子。按照第 4.D 节所述，在低体积 384 孔板中进行了 MTase-Glo™ Assay。发光值使用 Infinite® 1000 Pro 微孔板读数器（Tecan）测量。数据分析使用 Excel® 软件完成。实线表示均值，虚线表示  $\pm 3$  标准差。

#### 用户需提供的材料

（溶液成分见第 5 节。）

- 4X 反应缓冲液
- EHMT2-G9a 或感兴趣的甲基转移酶
- 感兴趣的甲基转移酶底物，例如源自 H3 的肽段（1-25）
- 完全不透光的白色 96 孔板、384 孔板、低体积 384 孔板或 1536 孔板（不要使用黑色或透明板）
- 多通道移液器或自动化移液工作站
- NANOpure® 超纯水或等效纯度的水
- 与测定板兼容的台式离心机
- 微孔板用摇床
- 平板读数式发光仪

**注意：**如需，可按照第 3.C 和 3.D 节所述，通过 SAH 的系列稀释来生成 SAH 标准曲线，以关联发光值和 SAH 浓度。请确保在测定板上或使用单独的板为 SAH 标准品预留孔位。

每个孔所需的反应组分体积如下：

反应组分	用于 96 孔板所需体积	用于半区 96 孔板或 384 孔板所需体积	用于低体积 384 孔板或 1536 孔板所需体积
甲基转移酶反应，包括：酶，底物，和任何测试化合物	20μl	8μl	4μl
制备好的 5X MTase-Glo™ Reagent	5μl	2μl	1μl
MTase-Glo™ Detection Solution	25μl	10μl	5μl

#### 准备：

- 计算实验所需 1X 反应缓冲液、4X 反应缓冲液、5X MTase-Glo™ Reagent 和 MTase-Glo™ Detection Solution 的体积。按照第 3.B 节所述制备 1X 反应缓冲液。将 1X 和 4X 反应缓冲液及 MTase-Glo™ Detection Solution 平衡至室温。将 10X MTase-Glo™ Reagent 置于冰上解冻。5X MTase-Glo™ Reagent 将在步骤 5 中准备。  
可选：按照第 3.C 节所述，准备用于构建 SAH 标准曲线的 SAH 标准样品。
- 在 1X 反应缓冲液中配制含有 15μM SAM 和 15μM H3 衍生肽（1-25）的底物溶液，操作如下：

组分	体积
4X reaction buffer	250μl
1mM H3-derived peptide (1-25)	15μl
1mM SAM	15μl
NANOPure® water	720μl
总体积	1ml

充分混匀。

- 将 EHMT2-G9a 在 1X 反应缓冲液中稀释，以便在步骤 7 中每反应加入 1ng。

**注意：**无论使用何种板型，每反应均使用 1ng EHMT2-G9a。（此描述仅针对示例中所用 EHMT2-G9a，若使用其他酶进行检测，应对不同板型反应的酶用量进行优化和调整。）

- SAH 标准品（可选）：**将第 3.C 节中准备的 96 孔板中各个 SAH 标准品转移如下所示体积到为 SAH 标准曲线预留的孔中。

用于 96 孔板所需体积	用于半区 96 孔板或 384 孔板所需体积	用于低体积 384 孔板或 1536 孔板所需体积
20μl	8μl	4μl

#### 4.D. 确定 Z' 因子 (续)

5. 在使用前彻底混合解冻的 MTase-Glo™ Reagent。根据步骤 9 的需求，通过增减下方提供的成分体积来配制所需体积的 5X MTase-Glo™ Reagent。轻轻颠倒混匀，避免剧烈振荡。在使用前，使 5X MTase-Glo™ Reagent 达到室温。

组分	体积
MTase-Glo™ Reagent, 10X	250μl
NANOPure® water (或同等纯度的水)	250μl
总体积	500μl

注意：

- a. 在使用前立即配制 5X MTase-Glo™ Reagent，并仅配制当次实验所需量。不要冷冻保存未用完的 5X MTase-Glo™ Reagent。
- b. 使用后，将剩余的 10X MTase-Glo™ Reagent 分装成单次使用剂量的小份，并储存在 -65°C 以下。

检测流程：

6. 通过向半个测定板中的每个孔添加如下所示体积的 1X 反应缓冲液，来准备无 EHMT2-G9a 的反应。如需构建 SAH 标准曲线，请确保预留孔位。

用于 96 孔板所需体积	用于半区 96 孔板或 384 孔板所需体积	用于低体积 384 孔板或 1536 孔板所需体积
10μl	4μl	2μl

7. 通过向另一半测定板中的每个孔添加如下所示体积的 1X 反应缓冲液中稀释的 EHMT2-G9a，来准备 EHMT2-G9a 反应。

用于 96 孔板所需体积	用于半区 96 孔板或 384 孔板所需体积	用于低体积 384 孔板或 1536 孔板所需体积
10μl	4μl	2μl

8. 向所有孔中加入步骤 2 中准备的如下所示体积的底物溶液。使用台式板离心机以 1,000rpm 离心 1-2 分钟，确保试剂沉降至孔底。摇动板子 1-2 分钟进行混匀。

用于 96 孔板所需体积	用于半区 96 孔板或 384 孔板所需体积	用于低体积 384 孔板或 1536 孔板所需体积
10μl	4μl	2μl

9. 向所有孔中加入如下所示体积的步骤 5 中准备的室温 5X MTase-Glo™ Reagent。使用台式离心机以 1000rpm 离心 1-2 分钟，确保试剂沉降到孔底。摇动板子 1-2 分钟混匀，并在室温下孵育 60 分钟。

用于 96 孔板所需体积	用于半区 96 孔板或 384 孔板所需体积	用于低体积 384 孔板或 1536 孔板所需体积
5μl	2μl	1μl

10. 向所有孔中加入指定体积的室温 MTase-Glo™ Detection Solution。使用台式离心机以 1000rpm 离心 1-2 分钟，确保试剂位于孔底。摇动板子 1-2 分钟混匀，并在室温下再孵育 60 分钟。

用于 96 孔板所需体积	用于半区 96 孔板或 384 孔板所需体积	用于低体积 384 孔板或 1536 孔板所需体积
25μl	10μl	5μl

**注意：**使用后，将剩余的 MTase-Glo™ Detection Solution 分装成单次使用分量的等份，并储存在 -30°C 至 -10°C。

11. 使用平板读数式发光仪测量发光值。利用 Excel® 或类似软件计算 Z' 因子。

## 5. 缓冲液和溶液的组成

### 4X Reaction Buffer

80mM	Tris buffer, pH 8.0
200mM	NaCl
4mM	EDTA
12mM	MgCl <sub>2</sub>
0.4mg/ml	BSA
4mM	dithiothreitol (DTT)

**注意：**当稀释至 1X 时，反应缓冲液中包含 0.1mg/ml 的 BSA 和 1mM 的 DTT，以稳定酶活性。如有需要，您可以根据所研究的甲基转移酶选择使用另一种合适的蛋白质载体。

### Test Compound Dilution Buffer

20mM	Tris buffer, pH 8.0
50mM	NaCl
1mM	EDTA
3mM	MgCl <sub>2</sub>
0.1mg/ml	BSA
1mM	dithiothreitol (DTT)

test compound solvent

**注意：**测试化合物稀释缓冲液的成分几乎与 1X 反应缓冲液相同；唯一的区别是包含了测试化合物溶剂。为了制备测试化合物稀释缓冲液，需向 4X 反应缓冲液中添加测试化合物溶剂，使其最终浓度等于第 4.C 节中测试化合物储备液的溶剂浓度。最后，使用 NANOpure® 超纯水或同等纯度的水将缓冲液稀释至 1X 最终浓度。

## 6. 疑难解答

如果您遇到的问题在此没有列出，请联系普洛麦格（北京）生物技术有限公司或当地经销商。

联系信息见：[www.promega.com](http://www.promega.com) 电子邮箱：[chinatechserv@promega.com](mailto:chinatechserv@promega.com)

问题	原因和参考建议
高发光信号	一个或多个反应成分被 ATP、ADP 或其他核苷酸污染。避免使用处理过含 ATP 或 ADP 溶液的工作区和移液器。使用防气溶胶的移液吸头。通过用洗涤剂溶液或乙醇擦拭并用清水冲洗来消毒工作台表面。至少用蒸馏水冲洗三次移液管和其他实验室器皿。对于自动分配系统，替换任何用于分配含 ATP 溶液的部件。
	组装甲基转移酶反应时使用了其他来源的 SAM，而该来源被 SAH 污染。仅使用 MTase-Glo™ Methyltransferase Assay 试剂盒中提供的 SAM。
	酶被 ATP 或其他腺苷核苷酸污染。透析酶以去除核苷酸。确保将酶储存在适当的缓冲液中并保持适宜的温度。
	测试化合物含有腺苷或其衍生物，导致背景发光增加。为了检测腺苷核苷酸的存在，进行两次不加酶或底物的 MTase-Glo™ 反应：一个加入测试化合物，一个不加。比较这些反应的发光强度。如果在加入测试化合物的情况下发光增强，表明被腺苷或其衍生物污染。 注意：在筛选 1280 种化合物的 LOPAC 库（Sigma）时，我们观察到的假阳性率低于 0.5%，并且只有两种化合物增加了发光。

问题	原因和参考建议
低发光信号	使用了错误的检测平板。仅使用完全不透光的白色板。不要使用黑色或透明板。
	MTase-Glo™ Reagent 储存不当。在使用前立即制备 MTase-Glo™ Reagent，并且只为当次实验制备足够的量；不要冷冻已配制的 MTase-Glo™ Reagent。在使用前轻轻混匀 MTase-Glo™ Reagent 和 MTase-Glo™ Detection Solution。未使用的 10X MTase-Glo™ Reagent 应以单次使用分量的小份形式在 -65°C 以下温度保存。未使用的 MTase-Glo™ Detection Solution 应在 -30°C 至 -10°C 以单次使用的小份形式保存。避免两种试剂反复冻融。
	甲基转移酶反应中未添加底物。确保向反应中添加底物。包括 SAH 标准品作为阳性对照反应。
	测试化合物抑制了 MTase-Glo™ Detection Solution 的某个组分（例如，ATP 生成酶或萤光素酶）。为了识别抑制剂，向两个试管中各加入 10μM 腺苷（A），并仅向其中一个试管中加入测试化合物。进行 MTase-Glo™ 检测。比较这些反应的发光情况。测试化合物存在下发光减少表明抑制了 MTase-Glo™ 检测。
	为了识别萤光素酶抑制剂，向两个试管中各加入 1μM ATP，并仅向其中一个试管中加入测试化合物。进行 MTase-Glo™ 检测，但省略 MTase-Glo™ Reagent（混合物与 MTase-Glo™ detection solution: 1:1）。比较这些反应的发光情况。测试化合物存在下低光输出表明萤光素酶受到抑制。注意：在筛选 1280 种化合物的 LOPAC 库（Sigma）时，我们观察到的假阳性率低于 0.2%，并且只有两种化合物抑制了萤光素酶。
	反应被测试化合物的溶剂所抑制。尽量减少溶剂浓度，或使用不同的溶剂溶解测试化合物。进行包含溶剂但不含测试化合物的对照反应，以测试溶剂对测定性能的影响。MTase-Glo™ 检测不受最高达 2% 乙醇或 2% DMSO 存在的影响。
	发光仪灵敏度不够。确保使用能够测量 0.5μM SAH 产生的净发光信号（即，相对于背景的发光强度变化）的发光计。第 3.C 节中准备的 SAH 标准品可用于评估发光仪的灵敏度。

## 7. 参考文献

1. Luo, M. (2012) Current chemical biology approaches to interrogate protein methyltransferases. *ACS Chem. Biol.* **7**, 443–63.
2. Lu, Q. et al. (2012) Perspectives on the discovery of small-molecule modulators for epigenetic processes. *J. Biomol. Screen.* **17**, 555–71.
3. Carr, S.M. and La Thangue, N.B. (2011) Cell cycle control by a methylation-phosphorylation switch. *Cell Cycle* **10**, 733–4.
4. Roadmap Epigenomics Consortium (2015) Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature* **518**, 317–30.
5. Okano, M. et al. (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**, 247–57.
6. Horiuchi, K. Y. et al. (2013) Assay development for histone methyltransferases. *Assay Drug Dev. Technol.* **11**, 227–36.
7. Ott, H.M. et al. (2014) A687V EZH2 is a driver of histone H3 lysine 27 (H3K27) hypertrimethylation. *Mol. Cancer Ther.* **13**, 3062–73.
8. McCabe, M.T. et al. (2012) EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature* **492**, 108–12.
9. Zhang, J., Chung, T.D. and Oldenburg, K.R. (1999) A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen.* **4**, 67–73.

## 8. 相关产品

产品	规格	目录号
AMP-Glo™ Assay*	1,000 assays	V5011
ADP-Glo™ Kinase Assay	1,000 assays	V9101
UDP-Glo™ Glycosyltransferase Assay*	200 assays	V6961
Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assay*	10ml	V6711
GTPase-Glo™ Luminescent Assay System	1,000 assays 10,000 assays	V7681 V7682
Succinate-Glo™ JmjC Demethylase/Hydroxylase Assay*	1,000 assays	V7990

\* 提供更多规格选择。

## 发光仪

产品	规格	目录号
GloMax® Discover System	each	GM3000
GloMax® Explorer System Fully Loaded Model	each	GM3500
GloMax® Explorer System with Luminescence and Fluorescence	each	GM3510
GloMax® 96 Microplate Luminometer	each	E6501
GloMax® 96 Microplate Luminometer w/Single Injector	each	E6511
GloMax® 96 Microplate Luminometer w/Dual Injectors	each	E6521

### 9. 更改总结

对本文件 3/24 修订版所做的以下更改：

1. 更正了图 9 的图例，将 0.5ng 更改为 0.5μg。
2. 更新了字体和封面图片。
3. 进行了轻微的文字编辑。

<sup>(a)</sup>U.S. Pat. Nos. 7,741,067, 8,361,739 and 8,603,767, Japanese Pat. No. 4485470 and other patents pending.

<sup>(b)</sup>U.S. Pat. Nos. 6,602,677, 7,241,584, 8,030,017 and 8,822,170, European Pat. No. 1131441, Japanese Pat. Nos. 4537573 and 4520084 and other patents pending.

© 2015–2024 Promega Corporation. All Rights Reserved.

GloMax and Kinase-Glo are registered trademarks of Promega Corporation. AMP-Glo, GTPase-Glo and MTase-Glo are trademarks of Promega Corporation.

Excel and Windows are registered trademarks of Microsoft Corporation. GraphPad Prism is a registered trademark of GraphPad Software, Inc. Infinite is a registered trademark of Tecan AG Corporation. NANOpure is a registered trademark of Barnstead/Thermolyne Corporation.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.