

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：E-BC-F051

产品规格：96T(40 samples)

检测仪器：荧光酶标仪(激发波长：355 nm、发射波长：460 nm)

Elabscience®组蛋白去乙酰化酶（HDAC）荧光法 测试盒

Histone Deacetylase (HDAC) Activity Fluorometric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清(浆)、动物组织及细胞样本中的组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 的活力。

检测原理

组蛋白去乙酰化酶(HDAC)是一类可对染色体的结构修饰和基因表达调控发挥重要作用的蛋白酶。早前研究表明 HDAC 与肿瘤具有密切的关系,过度表达会导致各种类型的癌症以及其它神经系统疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病、心脏和肺部疾病。

检测原理: HDAC 特异性切割荧光底物, 荧光基团发出荧光, 在激发波长 355 nm, 发射波长 460 nm 处检测荧光。试剂盒中使用特异性抑制剂抑制酶活, 排除非特异性酶活的影响。

本试剂盒检测动物组织和细胞样本时, 需测定总蛋白浓度, 推荐使用 BCA 法(货号: E-BC-K318-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size) (96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	20 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	0.22 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	抑制剂 (Inhibitor)	0.1 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	辅因子 (Co-factor)	1.1 mL×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	1 mmol/L 标准品溶液 (1 mmol/L Standard Solution)	0.4 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	黑色酶标板	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：荧光酶标仪(激发波长：355 nm、发射波长：460 nm)、恒温箱(37°C)

试剂：生理盐水(0.9% NaCl)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温(25°C)。

② 试剂二工作液的配制：

按试剂二：试剂一 = 1：9的体积比配制，按需配制，置于冰上避光待用，稀释后的试剂二工作液-20°C条件下可保存2天。

③ 试剂三工作液的配制：

按试剂三：试剂一 = 1：49的体积比配制，按需配制，置于冰上避光待用，稀释后的试剂三工作液-20°C条件下可保存5天。

④ 50 μmol/L标准品的配制：

按试剂五：试剂一 = 1：19的体积比配制，避光待用，现配现用，当天使用有效。

⑤ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μmol/L)	0	5	10	20	25	30	40	50
50 μmol/L 标准品(μL)	0	20	40	80	100	120	160	200
试剂一(μL)	200	180	160	120	100	80	40	0

样本准备

① 样本处理

血清(浆)：直接测定。

组织样本：按照组织样本质量(g)：生理盐水(0.9%NaCl)体积(mL) = 1：9的比例匀浆，4°C，10000 × g离心10 min，取上清置于冰上待测，4 h内检测有效，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

细胞样本：取 1×10^6 个细胞，加入200 μ L生理盐水(0.9%NaCl)匀浆，4°C，10000 × g离心10 min，取上清置于冰上待测，4 h内检测有效，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.019-1.027 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠肝组织	不稀释	10%小鼠肺组织	不稀释
10%小鼠肾组织	不稀释	10%小鼠脾脏组织	不稀释
10%小鼠脑组织	不稀释	10%小鼠心脏组织	不稀释
10%小鼠肌肉组织	不稀释	1×10^6 个 293T 细胞	不稀释
1×10^6 个 Hela 细胞	不稀释	1×10^6 个 HL-60 细胞	不稀释
小鼠血清	不稀释	人血浆	不稀释

注：稀释液为生理盐水(0.9%NaCl)。

操作步骤

- ① 标准孔：取 20 μ L 不同浓度的标准品溶液分别加入相应的酶标孔中。
测定孔：取 20 μ L 待测样本加入相应的酶标孔中。
对照孔：取 20 μ L 待测样本加入相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①的标准孔和测定孔中加入 100 μ L 试剂一。
向步骤①的对照孔中加入 80 μ L 试剂一。
- ③ 向步骤②的各孔中加入 20 μ L 试剂二工作液。
- ④ 向步骤③的对照孔中加入 20 μ L 试剂三工作液。
- ⑤ 室温(25℃)下避光孵育 20 min。
- ⑥ 向步骤⑤的各孔中加入 20 μ L 试剂四。
- ⑦ 振板 5 s，室温(25℃)避光孵育 20 min 后荧光酶标仪在激发波长 355 nm，发射波长 460 nm 下检测各孔荧光值。

操作表

	标准孔	测定孔	对照孔
不同浓度的标准品溶液(μ L)	20	--	--
待测样本(μ L)	--	20	20
试剂一(μ L)	100	100	80
试剂二工作液(μ L)	20	20	20
试剂三工作液(μ L)	--	--	20
室温(25℃)下避光孵育 20 min			
试剂四(μ L)	20	20	20
振板 5 s，室温(25℃)避光孵育 20 min 后荧光酶标仪在激发波长 355 nm，发射波长 460 nm 下检测各孔荧光值。			

本试剂盒检测动物组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

血清(浆)样本中组蛋白去乙酰化酶(HDAC)活力计算公式:

定义: 25°C 条件下, 每升血清或血浆样本每分钟催化底物产生 1 μmol 的产物所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{HDAC 活力(U/L)} = (\Delta F - b) \div a \div T \times f$$

组织或细胞样本中组蛋白去乙酰化酶(HDAC)活力计算公式:

定义: 25°C 条件下, 每克组织或细胞蛋白每分钟催化底物产生 1 μmol 的产物所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{HDAC 活力(U/gprot)} = (\Delta F - b) \div a \div T \times f \div C_{\text{pr}}$$

注解:

y: 标准品荧光值-空白荧光值(标准品浓度为 0 时的荧光值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔF : 样本的绝对荧光值($\Delta F = F_{\text{测定}} - F_{\text{对照}}$)

T: 反应时间 20 min

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr} : 待测样本的蛋白浓度, gprot/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

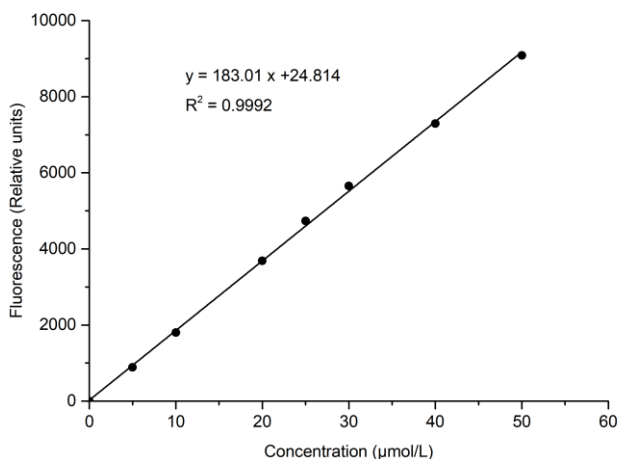
检测范围	0.019-1.027 U/L	批间差	6.9-8.8%
灵敏度	0.019 U/L	批内差	3.3-4.6%
稀释回收率	96-100%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20 μL ，按照操作步骤进行实验，荧光值如下表所示：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	5	10	20	25	30	40	50
荧光值	3039	3908	4837	6724	7729	8696	10328	12212
	2895	3808	4699	6580	7678	8544	10192	11888
平均荧光值	2967	3858	4768	6652	7704	8620	10260	12050
绝对荧光值	0	891	1801	3685	4736	5653	7293	9083

② 绘制标曲(如下图)：



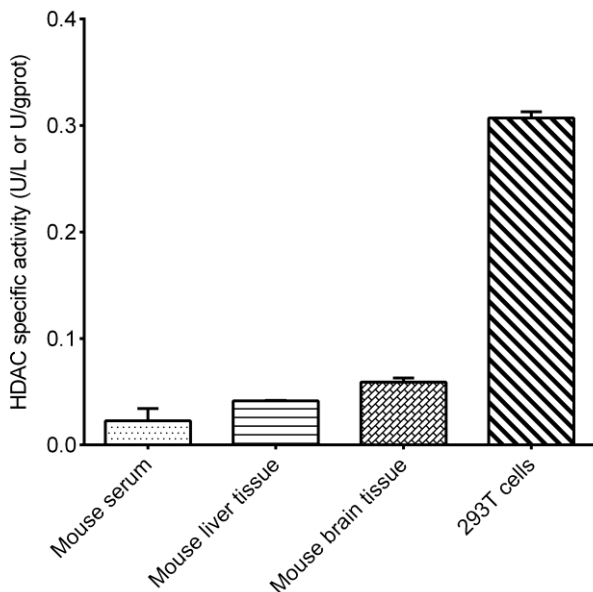
附录2 实例分析

例如小鼠肝组织(数据仅供参考):

取20 μL 10 %小鼠肝组织匀浆加入到酶标板孔中, 按操作表操作, 结果如下: 标准曲线: $y = 183.01x + 24.814$, 测定孔荧光值 $F_{\text{测定}}$ 为5012, 对照孔荧光值 $F_{\text{对照}}$ 为3098, $\Delta F = F_{\text{测定}} - F_{\text{对照}} = 5012 - 3098 = 1914$, 测定出10%小鼠肝组织的蛋白浓度为12.45 gprot/L, 计算结果为:

$$\text{HDAC活力(U/gprot)} = (1914 - 24.814) \div 183.01 \div 20 \div 12.45 = 0.041 \text{ U/gprot}$$

按说明书操作, 测定小鼠血清(加样量20 μL)、10%小鼠肝组织(蛋白浓度为12.45 gprot/L, 加样量20 μL)、10%小鼠脑组织(蛋白浓度为3.64 gprot/L, 加样量20 μL)、293T细胞(1×10^6 个, 蛋白浓度为0.63 gprot/L, 加样量20 μL)中的HDAC活力(如下图):



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

