（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!）

产品货号：GBQ039

产品规格：48T(30 samples)/96T(78 samples)

检测仪器：荧光酶标仪(激发波长:340 nm，发射波长:440 nm)

Elabscience®去乙酰化酶 1(SIRT-1)荧光法测试盒

Sirtuin 1 (SIRT-1) Activity 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动物组织和细胞样本中的组蛋白去乙酰化酶(SIRT-1)的活力。

检测原理

Sirtuins(SIRT)家族蛋白包括 SIRT-1 和 SIRT-7，是一种具有烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide，NAD)依赖性的组蛋白去乙酰化酶，其在器官和组织中普遍表达。基于氨基酸序列 Sirtuins 家族蛋白可分为 4 型，SIRT-1 和 SIRT-3 为 1 型，SIRT-4 为 2 型，SIRT-5 为 3 型，SIRT-6、SIRT-7 为 4 型。SIRT-1 在器官和组织中广泛分布，主要存在于胞质，需进入细胞核内才能发挥作用。有些药物可通过抑制 SIRT-1 入核，调控一些基因的表达。

本测试盒采用荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)的方法检测。荧光底物被 SIRT-1 去乙酰化后，生成活化荧光底物，活化荧光底物能够被蛋白酶分解，生成荧光物质的最大激发波长为 340 nm，最大发射波长为 440 nm。

本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法。(货号：GBQ162)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	7.5 mL×1 瓶	15 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	0.075 mL×1 支	0.15 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	促进剂 (Accelerant)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	终止剂 (Activator)	1.4 mL×1 支	1.4 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 (1mmol/L Standard Solution)	0.25 mL×1 支	0.5 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	1 板		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 340 nm，发射波长 440 nm)

试剂：生理盐水(0.9% NaCl)

试剂准备

① 检测前，所有的试剂平衡至室温；

② 试剂三工作液的配制；

每支试剂三加入1 mL双蒸水溶解，未用完部分可-20°C避光保存2周。

③ 反应工作液的配制：

按照试剂一：试剂二：试剂三工作液=100: 1: 2的体积比混匀，置于冰上避光待用，现配现用，按需配制，2 h内使用有效。

④ 100 μmol/L标准品溶液的配制；

取0.05 mL的试剂五加入0.45 mL双蒸水稀释，现配现用，按需配制，配好的标准品溶液置于冰上避光待用，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**	**20**	**30**	**40**	**60**	**80**	**90**	**100**
100 μmol/L 标准品溶液(μL)	0	20	30	40	60	80	90	100
双蒸水(μL)	100	80	70	60	40	20	10	0

样本准备

① 样本处理

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匀浆，10000 × g离心10 min，取上清待测，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0.2 mL生理盐水(0.9% NaCl)匀浆，离心后取上清待测，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：0.03-9.66 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%大鼠肝组织	不稀释	10%大鼠肺组织	不稀释
10%小鼠脑组织	不稀释	1×10^6 CHO 细胞	不稀释

注：稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

实验关键点

① 样本中若含有蛋白酶抑制剂，可能导致酶活不能测定。

② 样本处理后尽可能在 4 h 内检测。

操作步骤

① 标准孔：取 5 μL 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 5 μL 待测样本加入相应的酶标孔中；
对照孔：取 5 μL 生理盐水加入相应的酶标孔中；

② 向①中各标准孔加入 100 μL 试剂一，各测定孔和对照孔加入 100 μL 反应工作液；

③ 振板 3 s，37°C 孵育 20 min；

④ 向②中各孔中加入 20 μL 试剂四；

⑤ 振板 3s，37°C 孵育 15 min；

⑥ 荧光酶标仪设置激发波长 340 nm，发射波长 440 nm 测定各孔荧光值。

操作表

	标准孔	测定孔	对照孔
不同浓度的标准品溶液(μL)	5	--	--
待测样本(μL)	--	5	--
生理盐水(μL)	--	--	5
试剂一(μL)	100	--	--
反应工作液(μL)	--	100	100
振板 3 s，37°C 孵育 20 min。			
试剂四(μL)	20	20	20
振板 3 s，37°C 孵育 15 min。			
荧光酶标仪设置激发波长 340 nm，发射波长 440 nm 测定各孔荧光值。			

本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法。(货号：GBQ162)。

结果计算

标准曲线：y = ax + b

组织和细胞样本中 SIRT-1 酶活力计算公式:

定义：37°C 条件下，每克组织或细胞蛋白每分钟转化底物生成 1 μmol AMC 所需要的 SIRT-1 酶量为一个活力单位。

$$\text{SIRT-1 活性 (U/gprot)} = (\triangle F - b) \div a \div T \div C_{pr} \times f$$

注解：

y：标准孔荧光值-空白孔荧光值(标准品浓度为 0 时荧光值)

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

△F：测定孔荧光值-对照孔荧光值($F_{测}$-$F_{对}$)

T：酶促乙酰化反应时间，20 min

C_{pr}：组织或细胞的蛋白浓度，gprot/L

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

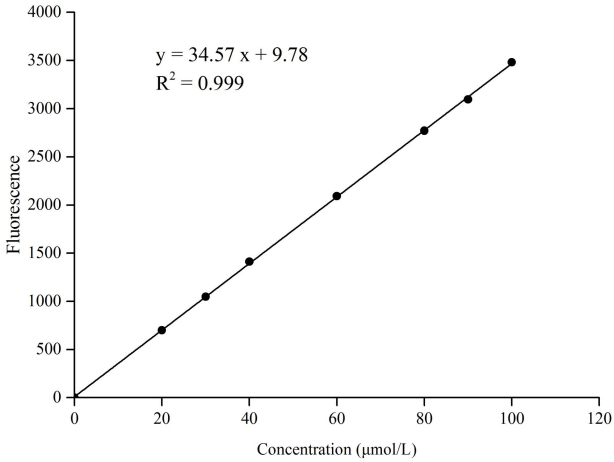
检测范围	0.03-9.66 U/L	**批间差**	8.1-9.9 %
灵敏度	0.03 U/L	**批内差**	3.0-5.0 %
稀释回收率	90-100 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度标准品加样量5 μL，按照操作步骤进行实验，荧光值如下表所示：

标准品浓度 (μmol/L)	0	20	30	40	60	80	90	100
测定荧光值	26	717	1086	1413	2073	2736	3045	3474
	16	723	1050	1455	2154	2847	3189	3531
平均荧光值	21	720	1068	1434	2114	2792	3117	3503
绝对荧光值	0	699	1047	1413	2092	2770	3096	3481

②绘制标曲(如下图)：



附录2 实例分析

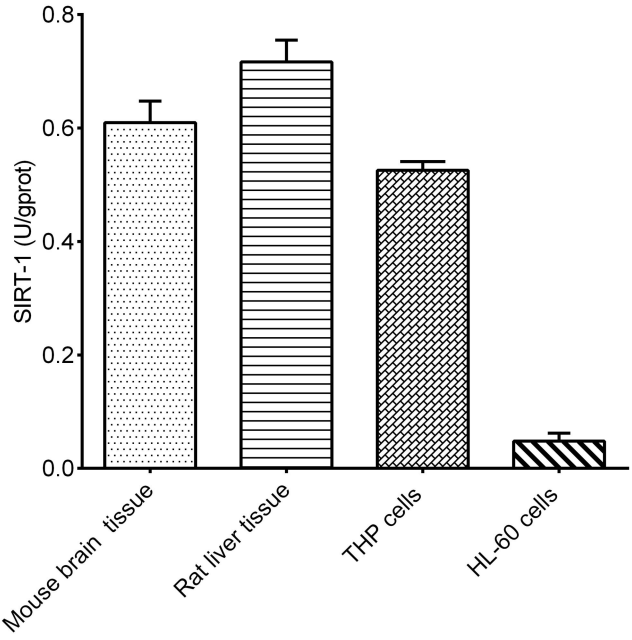
例如检测小鼠脑组织(数据仅供参考)：

取5 μL 10%的小鼠脑组织匀浆上清液按操作表操作，结果如下：

标准曲线：y = 34.57 x + 9.78，测定孔荧光值$F_{测}$ = 2017，对照孔荧光值$F_{对}$ = 1270, △F = 2017 - 1270 = 747, 10%小鼠脑组织的蛋白浓度为1.78 gprot/L计算结果为：

$$\text{SIRT-1 活性 (U/gprot)} = (747 - 9.78) \div 34.57 \div 20 \div 1.78 = 0.60 \text{ U/gprot}$$

按照说明书操作，测定小鼠脑组织(10%组织匀浆蛋白浓度为1.78 gprot/L，加样量为5 μL)、大鼠肝组织(10%组织匀浆蛋白浓度为8.15 gprot/L，加样量为5 μL)、1×10^6个THP细胞(蛋白浓度为2.21 gprot/L，加样量为5 μL)和1×10^6个HL-60细胞(蛋白浓度为2.94 gprot/L，加样量5 μL)中SIRT-1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同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。