天净沙系列

CAT#:EC3.10.1.1

低温运输和保存

N-磺基葡萄糖胺硫酸水解酶活性测定试剂盒

N-Sulfoglucosamine Sulfohydrolase Assay Kit

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是用于测定 N-磺基葡萄糖胺硫酸水解酶（N-Sulfoglucosamine Sulfohydrolase，EC3.10.1.1，SGSH）活性的试剂盒。其原理是 SGSH 可以催化 4-MU-α-GlcNS 反应生成 4-MU-α-GlcNH2，4-MU-α-GlcNH2 又在α-葡萄糖苷酶催化下释放 4-甲基伞形花酮，4-甲基伞形花酮可在 355 nm 激发产生 460 nm 荧光，通过测定荧光值上升的速度即可间接测定 SGSH 酶活性。本产品具有如下特点：

1. 即开即用，使用便捷，用户不需要优化条件，只需准备待测样本。
2. 最低检测限为 0.18 U，线性范围在 0.25 U-0.71 U 之间。
3. 本试剂盒 1 个酶活性单位的定义是在 47℃ pH 6.5 的条件下,每分钟能催化 1 μmol 底物转化所需的酶量。由于 1 个 SGSH 底物分子的转化将产生 1 个 4-甲基伞形花酮分子,故 1 个酶活性单位相当于在 47℃ pH 6.5 的条件下每分钟催化 1 μmol 4-甲基伞形花酮产生所需的酶量
4. 本产品足够 100 次 96 孔板测定实验，每次 40 μL 反应体系。
5. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品使用小扁盒包装

成份	编号	规格	包装
SGSH 活性测定反应液	EC3.10.1.1r	110 mL	125 mL 本色瓶
SGSH 底物干粉	EC3.10.1.1s	100 T	125 mL 本色瓶
α-葡萄糖苷酶干粉	CAS:9001-42-7	100 T	1.5 mL 红盖管
α-葡萄糖苷酶储存液	5-C9001-42-7	2 mL	2 mL 本色管
5 μM 荧光标准品溶液	EC3.10.1.1b	100 μL	0.5 mL 棕色管
使用手册	scEC3.10.1.1	1 份	无

运输及保存

低温运输，4℃保存，有效期一年。

自备物品

待测样品、超纯水、蛋白浓度测定试剂盒、比色皿及与之匹配的荧光光度计、96 孔板及与之匹配的荧光光度计。

使用方法

一、首次使用本试剂盒时配制下列溶液

1. 配制 SGSH 底物液：将 100 mL SGSH 活性测定反应液加入到装有 SGSH 底物干粉的瓶中，颠倒摇晃 20 次，得 SGSH 底物液。
2. 配制α-葡萄糖苷酶液：将 1 mL α-葡萄糖苷酶储存液加入到装有α-葡萄糖苷酶干粉的瓶中，颠倒摇晃 20 次，得α-葡萄糖苷酶液。
3. 如果一次实验没有用完上述溶液，需要放-20℃或更低温度保存。

二、待测样本的制备

4. 用自选方式制备待测样本，样本溶于缓冲液中，缓冲液 pH 值控制为 6.5。注意：

由于 Zn2+、Cu2+等还金属离子会严重影响 SGSH 酶活性，故样本中不得含有这些物质。同时，由于本试剂盒测定的是在 355 nm 激发产生 460 nm 荧光的物质，故样本中不得有可以在 460 nm 处产生荧光的成分。

5. 预留 10 mL 最后溶解样本的样本溶解液，作后续测荧光值时的阴性对照。
6. 用自备试剂测定待测样本的蛋白浓度，以备后续计算速率时使用。

三、标准曲线梯度稀释液的制备

7. 在每管中加入 50 μL SGSH 活性测定反应液。盖上 0 号管作为对照。
8. 在 6 号管中加入 50 μL 5 μM 的荧光标准品溶液（试剂盒提供），涡旋 1 分钟混匀，得 2.5 μM 的荧光标准品稀释液。常温放置待用。
9. 换枪头，在 5 号管中加入 50 μL 2.5 μM 荧光标准品稀释液（上步稀释所得），涡旋 1 分钟混匀，得 1.25 μM 荧光标准品稀释液。常温放置待用。
10. 换枪头，在 4 号管中加入 50 μL 1.25 μM 荧光标准品稀释液（上步稀释所得），涡旋 1 分钟混匀，得 0.625 μM 荧光标准品稀释液。常温放置待用。
11. 重复上面的操作，直到在 1-6 号管中得到 2.5、1.25、0.625、0.313、0.156、0.078 μM 共 6 个荧光标准品稀释液，加上 0 号管共 7 个样本。常温放置待用。此溶液每次需新鲜配制。

四、SGSH 酶切反应设置

12. 如有 N 个待测样本，每个做 1 次重复，则反应数为 N+8，其中 N 个用于待测样本，1 个用于阴性对照，7 个用于标曲样本，如每个样本做重复，则反应数应相应地变动。以下按 1 个样做 1 次重复示例。
13. 按下表加入各成分：

成分	N 个样本管	阴性对照	7 个标曲管
自备样本溶解液	不加	20 μL	不加
SGSH 底物液	各 960 μL	960 μL	各 960 μL
各梯度的荧光标准品溶液	不加	不加	各 20 μL
N 个自备待测样本	各 20 μL	不加	不加
α-葡萄糖苷酶液	各 20 μL	20 μL	各 20 μL
总体积	1 mL	1 mL	1 mL

14. 摇晃 30 秒混合均匀，放 47℃保温，每 5 分钟在 355 nm 激发光/460 nm 发射光条件下记录一次荧光值，共 30 分钟。

五、数据分析

15. 从所有数据中减去空白对照值，然后进行下面的计算。

	16. 制作标准曲线求转换系数:6-0 号标准品的浓度分别为 2.5、1.25、0.625、0.313、0.156、0.078、0 μM，反应体积为 1 mL，故换算成绝对量分别为 100、50、25、12.5、6.25、3.13、0 pmol，以其为横轴，以测出的荧光值为纵轴，得到标曲方程式。R2 应大于 0.95（如果不是线性，需要跟厂家联系），其斜率即为转换系数。 17. 计算每个样本的斜率：以时间为横轴，以每个样本的荧光值为纵轴，得每个样本的线性区域（一般在前 5-15 分钟），然后计算出线性区斜率（速度）。 18. 计算每个样本酶活性单位数：本试剂盒一个 SGSH 酶活性单位的定义为在 47℃温度下每分钟释放 1 pmol 荧光物质的酶量，故 1 mL 体系中 SGSH 酶活性单位数=线性区斜率÷转换系数。 19. 由于 1 mL 反应孔中加入的样本体积是 20 μL，上步得到的酶单位数相当于 20 μL 待测样本的酶单位数，根据第 9 步或第 10 步计算出的蛋白浓度，可计算出 20 μL 样本中蛋白的μg 数，则酶的比活=20 μL 样本中的酶单位数/20 μL 样本中的蛋白μg 数。
关联产品	Skygen 环己基氨基磺酸硫酸水解酶活性测定试剂盒