

羧酸酯酶（CarE）活性 检测试剂盒微板法

使用说明书

产品货号：BP10192W

注意：请在试剂盒保质期内使用，具体保质期见外包装标签。

本产品仅供科学研究使用，不能用于临床诊断。

检测范围：0.125–5mmol/L

灵敏度：0.125mmol/L

有效期：6个月

保存温度：2–8℃和–20℃

检测原理:

羧酸酯酶(CarE)是一种广泛分布于细胞胞液、线粒体和内质网的多聚蛋白,主要催化酯、硫酸酯和酰胺的水解,参与生物的解毒过程,被称为生物体内的清除剂。羧酸酯酶催化乙酸-1-萘酯生成萘酚,进一步与固蓝显色剂反应生成有色物质,通过检测该有色物质在 450 nm 处的光吸收增加速率,进而得出羧酸酯酶(CarE)活性大小。本试剂盒检测组织样本时,需测定总蛋白浓度,推荐使用 BCA 法试剂盒。

注意事项:

1. 不能使用过期产品,不同货号 and 批号组分不得混用。
2. 本试剂开封后请尽快使用,以免空气、采样污染引起试剂变质。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 如果可能传播疾病,所有的样品都应管理好,按照规定的程序处理样品和检测装置。
5. 试剂严格按保存条件保存,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。试剂盒中如有提供粉剂,使用前请甩几下,使粉剂落入底部。

试剂盒组分：

试剂名称	规格（48T/40S）	规格（96T/88S）	保存条件
试剂一	50mL×1 瓶	100mL×1 瓶	2-8℃
试剂二	15mL×1 瓶	15mL×2 瓶	2-8℃，避光
试剂三	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃，避光
试剂四	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃，避光
标准品	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	2-8℃，避光

所需仪器耗材及试剂：

离心机、酶标仪、可调式移液器、蒸馏水、恒温箱、无水乙醇。

样本处理及要求:

1. **试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围**, 建议实验前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定, 根据预实验的结果, 结合本试剂盒的线性范围: 0.125-5mmol/L, 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, 样本的稀释液为试剂一。
2. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中, 建议做预实验验证其检测有效性。
3. **组织样本**: 按照组织质量 (g): 试剂一体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂一) 进行冰浴匀浆; 12000 g 4℃ 离心 30min, 取上清液待测。
4. **细菌、细胞样本**: 收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照每 200 万细菌或细胞加入 400 μ L 试剂一, 超声波破碎细菌或细胞 (功率 20%, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000 g 4℃ 离心 30min, 取上清液待测。
5. **血清 (浆) 等液体样本**: 直接测定。若浑浊, 离心后取上清测定。

检测前准备工作:

1. 请提前取出试剂盒，平衡至室温。
2. **试剂三**：临用前取一瓶试剂三，加 0.6mL 无水乙醇充分溶解。
3. **试剂四**：临用前取一瓶试剂四，加少量试剂二溶解。
4. **工作液配制**：临用前配制，向一瓶试剂二中，加入溶解后的试剂三和试剂四各一瓶，充分溶解，使用滤纸进行过滤，2-8℃避光保存，可用 1 周。
5. **标准品溶液的配制**：向标准品中加入 10mL 无水乙醇，溶解为 10mmol/L 的标准品母液。取标准品母液 1mL 至一新 EP 管中，加入 3mL 蒸馏水，混匀为 2.5mmol/L 的标准品溶液。把标准品溶液(2.5mmol/L)用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0、0.5、0.75、1、1.5、1.75、2、2.5mmol/L。（注：配制目标浓度的标准品工作液时，每次请根据表格从对应浓度的标准品溶液中取对应的体积与相应稀释液混合均匀后使用。）

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度 (mmol/L)	0	0.5	0.75	1	1.5	1.75	2	2.5
2.5mmol/L 标准品 (μ L)	0	40	60	80	120	140	160	200
蒸馏水(μ L)	200	160	140	120	80	60	40	0

也可根据实际样本来调整标准品浓度。按照标准孔加样体系操作，依据结果即可制作标准曲线；本说明书中的标曲是用蒸馏水稀释得出，若选取其他稀释液可选择重做标曲。

操作步骤：

1. 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。
2. 样本测定（在 96 孔板中依次加入）：

试剂名称(μL)	标准孔	测定孔
样本		5
不同浓度的标准品	5	
工作液	200	200

震荡混匀，在 450nm 处测定 3min 内 OD 值变化，第 10s 时立即测定测定孔 OD 值记为 A_1 ，第 190s 后检测标准孔和测定孔的 OD 值记为 A_2 。 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

注：

1. 如遇样本量过多，应分批次进行检测，可以先进行标准孔的检测，再进行样本的检测。
2. 加入工作液时尽量使用排枪。

实验结果结算：

1. 标准品拟合曲线： $y=ax+b$

2. 组织或细胞样本中 CarE 酶活计算公式：

定义：37℃条件下，每克组织或细胞蛋白每分钟催化底物产生 $1 \mu\text{mol}$ 的产物所需要的酶活为一个活力单位。

$$\text{CarE 酶活(U/g prot)}=(\Delta A-b) \div a \div T \times N \div C_{\text{pr}} \times 1000$$

3. 血浆(清)样本中 CarE 酶活计算公式：

定义：37℃条件下，每升血浆(清)每分钟催化底物产生 $1 \mu\text{mol}$ 的产物所需要的酶活为一个活力单位。

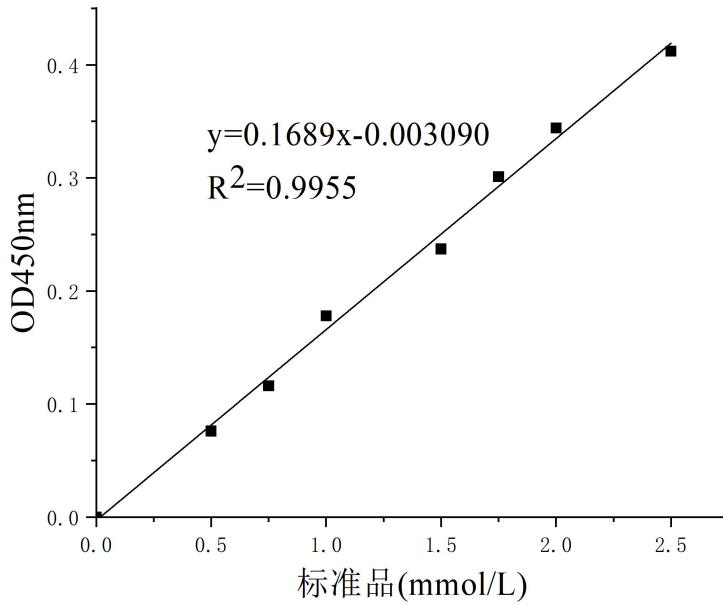
$$\text{CarE 酶活(U/L)}=(\Delta A-b) \div a \div T \times N \times 1000$$

注：

y: 标准品 OD 值-空白孔 OD 值 (标准品浓度为 0 时的 OD 值)	ΔA : 样本测定孔变化 OD 值, A_2-A_1
x: 标准品浓度	T: 反应时间, 3min
a: 标准曲线斜率	N: 样本的稀释倍数
b: 标准曲线截距	C _{pr} : 样本蛋白浓度, g prot/L
	1000: $1\text{mmol/L}=1000 \mu\text{mol/L}$

参考曲线:

$y=0.1689x-0.003090, R^2=0.9955$, x 是标准品的浓度 (mmol/L), y 是 ΔA 。



注意: 本图仅供参考, 应以每次实验数据所绘制标准曲线计算样本含量。