

(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-K579-M

产品规格: 48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器: 酶标仪(400-410 nm)

Elabscience[®]羧酸酯酶(CES)比色法测试盒

Carboxylesterase (CES) Activity Colorimetric 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)、动物组织及细胞中的羧酸酯酶(CES)活力。

检测原理

羧酸酯酶(Carboxylesterase, CES)是一种多聚蛋白,能高效催化水解羧酸酯、硫酸酯、氨基甲酸酯和酰胺等酯类物质。CES 可根据其水解特性将一些难溶性的羧酸盐类前药通过水解反应释放出有效的药物,其次,由于CES 具有高催化效率及高特异性,还可以调节各种代谢功能(酯类物质代谢、基因表达、物质运输和解毒等)。因此,检测CES 的活性对癌症的早期诊断与生物医药的研究都具有非常重要的意义。

CES 催化底物反应生成显色物质在波长 405 nm 处有最大吸收,通过测定 405 nm 处的 OD 值大小计算 CES 酶活。

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 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)	55 mL×1 瓶	55 mL×2 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	0.75 mL×1 支	1.5 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	10 mmol/L 标准品溶液 (10 mmol/L Standard Solution)	1 mL×1 支	1 mL×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板		1 板	
	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：酶标仪(400-410 nm，最佳检测波长 405 nm)、37 ℃ 恒温箱

试剂：双蒸水

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至25℃。

② 2.5 mmol/L标准品的配制：

将双蒸水:试剂三按体积比=3: 1配制，避光待用，现配现用，当天使用有效。

③ 工作液的配制：

将试剂一:试剂二按体积比=19: 1配制，避光待用，现配现用，当天使用有效。

④ 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(mmol/L)	0	0.50	0.75	1.00	1.50	1.75	2.00	2.50
2.5 mmol/L 标准品(μL)	0	40	60	80	120	140	160	200
双蒸水(μL)	200	160	140	120	80	60	40	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：按照组织样本质量(g)：试剂一体积(mL)=1：9的比例匀浆(如0.05 g组织样本，加入450 μ L试剂一)。4 $^{\circ}$ C，10000 \times 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：按照约 1×10^6 个细胞：试剂一体积(mL)=1：200比例匀浆(如 1×10^6 个细胞，加入200 μ L试剂一)。4 $^{\circ}$ C，10000 \times g离心10 min，取上清待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

血清(浆)样本：直接测定。

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：0.3-168.4 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	100-300	1×10^6 个 293T 细胞	不稀释
10%小鼠肾组织	100-300	1×10^6 个 HeLa 细胞	不稀释
10%大鼠肝组织	100-300	1×10^6 个 Jurkat 细胞	不稀释
10%小鼠脑组织	10-20	10%小鼠心组织	10-20
大鼠血清	10-20	小鼠血清	10-20
大鼠血浆	10-20	小鼠血浆	10-20
人血清	10-20		

注：稀释液为试剂一。

操作步骤

- ① 标准孔:取 20 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 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①中的各孔加入 180 μL 工作液。
- ③ 振板 5 s, 酶标仪 405 nm 波长下检测测定孔 OD 值 A_1 。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min 后检测测定孔和标准孔的 OD 值 A_2 。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度的标准品溶液(μL)	20	--
待测样本(μL)	--	20
工作液(μL)	180	180
振板 5 s, 酶标仪 405 nm 波长下检测测定孔 OD 值 A_1 。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min 后检测测定孔和标准孔的 OD 值 A_2 。		

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: E-BC-K318-M)。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

① 组织或细胞样本中 CES 活力计算公式:

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 μmol 的产物所需要的酶活为一个活力单位。

$$\text{CES 活力 (U/gprot)} = (\Delta A_{405} - b) \div a \div T \times f \div C_{pr} \times 1000$$

② 血浆(清)样本中 CES 活力计算公式:

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

$$\text{CES 活力 (U/L)} = (\Delta A_{405} - b) \div a \div T \times f \times 1000$$

注解:

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值, 标准曲线以标准孔 A₂ 值进行拟合)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔA₄₀₅: 样本测定孔变化 OD 值, A₂-A₁

T: 反应时间 15 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

1000: 单位换算, 1 mmol/L=1000 μmol/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

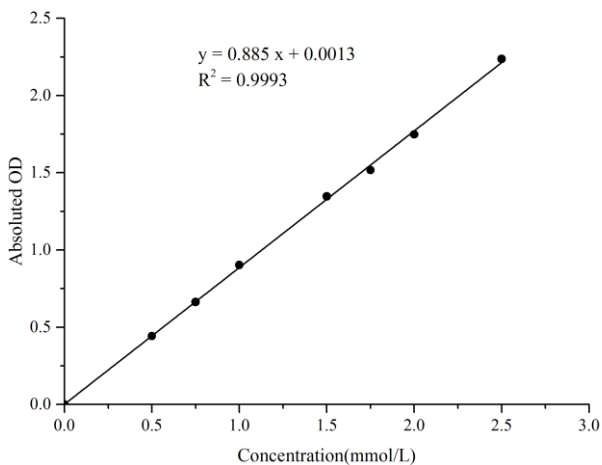
检测范围	0.3-168.4 U/L	批间差	2.7-11.0%
灵敏度	0.3 U/L	批内差	1.8-5.1%
回收率	100-105%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

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

标准品浓度 (mmol/L)	0	0.50	0.75	1.00	1.50	1.75	2.00	2.50
OD 值	0.097	0.543	0.778	1.006	1.444	1.621	1.878	2.308
	0.099	0.542	0.762	1.002	1.446	1.617	1.848	2.336
平均 OD 值	0.098	0.542	0.762	1.002	1.446	1.617	1.848	2.336
绝对 OD 值	0	0.443	0.663	0.903	1.347	1.518	1.749	2.237

② 绘制标曲(如下图):



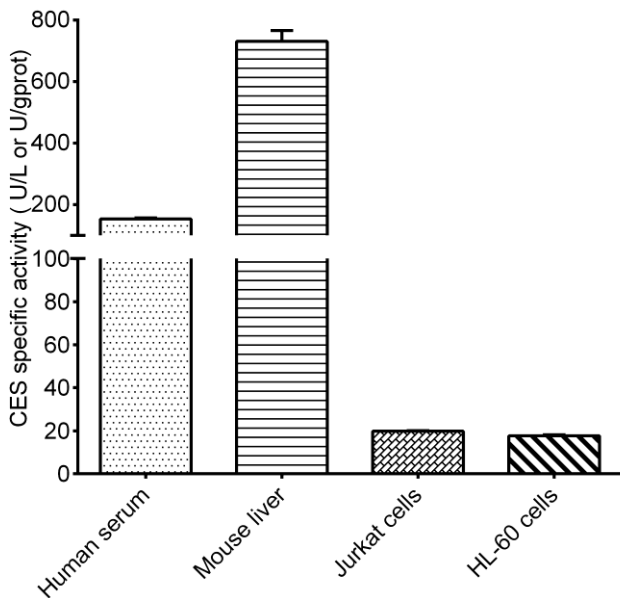
附录2 实例分析

例如小鼠肝组织(数据仅供参考):

取20 μL 稀释200倍的10%小鼠肝组织匀浆上清加入到酶标板孔中,按操作表操作,结果如下:标准曲线: $y = 0.885x + 0.0013$, A_1 值为0.209, A_2 值为0.990, $\Delta A_{405} = A_2 - A_1 = 0.990 - 0.209 = 0.781$, 10%小鼠肝组织的蛋白含量为15.067 gprot/L, 计算结果为:

$$\text{CES活力(U/gprot)} = (0.781 - 0.0013) \div 0.885 \div 15 \times 200 \div 15.067 \times 1000 = 779.6 \text{ U/gprot}$$

按说明书操作,测定人血清(稀释倍数为10,加样量20 μL)、小鼠肝组织(10%组织匀浆蛋白含量为15.067 gprot/L,稀释倍数为200,加样量20 μL)、Jurkat细胞(1.7×10^6 个,蛋白含量为0.555 gprot/L,加样量20 μL)、HL-60细胞(1.87×10^6 个,蛋白含量为0.941 gprot/L,加样量20 μL)中的CES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。

