（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-F052

产品规格：48T(32 samples)/ 96T(80 samples)

检测仪器：荧光酶标仪(激发波长：328 nm，发射波长：393 nm)

Elabscience®组织蛋白酶 D（CatD）荧光法测试盒

Cathepsin D (CatD) 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织蛋白酶 D（CatD）的活力。

检测原理

组织蛋白酶(Cathepsin D，CatD) 是一种重要的胞内天冬氨酸蛋白酶，在生物界中广泛存在。组织蛋白酶 D 具有多种生物功能，参与胞内蛋白质的降解，细胞凋亡和自噬等。

本试剂盒的检测原理是：CatD 将底物水解，生成显色物质，通过测定激发波长 328 nm，发射波长 393 nm 的荧光值变化来计算样本中组织蛋白酶 D 的活力。

本试剂盒检测动物组织与细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

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)	提取液 (Extraction Solution)	40 mL × 1 瓶	40 mL × 2 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 (Buffer Solution)	11 mL × 1 瓶	22 mL × 1 瓶	-20°C 避光保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 (Substrate)	1.1 mL × 1 支	2.2 mL × 1 瓶	-20°C 避光保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	10 mmol/L 标准品溶液 (10 mmol/L Standard Solution)	0.1 mL × 1 支	0.1 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：328 nm，发射波长 393 nm)，恒温箱(37°C)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温(25°C)。

② 工作液的配制：

将试剂三：试剂二按体积比= 4：1配制，按需配制，现配现用，避光4 h内有效。

③ 300 μmol/L标准品溶液的配制：

将试剂四：试剂二按体积比= 3：97配制，未用完的300 μmol/L标准品溶液可2 - 8°C保存1个月。

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(μmol/L)	**0**	**60**	**90**	**120**	**150**	**180**	**210**	**300**
300 μmol/L 标准品(μL)	0	40	60	80	100	120	140	200
试剂二(μL)	200	160	140	120	100	80	60	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)：试剂一体积(mL)= 1：9的比例匀浆，4ºC，12000 × g离心10 min，取上清液置于冰上待测，当天检测有效。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 μL试剂一匀浆，4ºC，12000 × g离心10 min，取上清置于冰上待测，当天检测有效。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：0.02-30.00 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%大鼠胰腺组织	1-2	10%大鼠脾脏组织	不稀释
10%大鼠小肠组织	1-2	10%大鼠脑组织	不稀释
10%小鼠胃组织	不稀释	10%大鼠肾组织	2-4
10%大鼠肝组织	2-8	1×10^6 个 Hela 细胞	不稀释
1×10^6 个 HL-60 细胞	不稀释	1×10^6 个 293T 细胞	不稀释
小鼠血清	1-2	小鼠血浆	不稀释

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 20 μL 工作液。

③ 向步骤②中各孔加入 160 μL 试剂二。

④ 振板 5 s，荧光酶标仪设置激发波长 328 nm，发射波长 393 nm，检测测定孔荧光值 F_1。

⑤ 37°C，避光孵育 10 min。振板 5 s，荧光酶标仪设置激发波长 328 nm，发射波长 393 nm，测定各孔荧光值 F_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)	20	20
试剂二(μL)	160	160
振板 5 s，荧光酶标仪设置激发波长 328 nm，发射波长 393 nm，检测测定孔荧光值 F_1。 37°C，避光孵育 10 min。振板 5 s，荧光酶标仪设置激发波长 328 nm，发射波长 393 nm，测定各孔荧光值 F2，标准品按 F2 值进行拟合。		

本试剂盒检测动物组织与细胞样本时，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 血清(浆)样本中组织蛋白酶(CatD)酶活计算公式:

定义：37°C 条件下，每升血清或血浆每分钟催化生成 1 μmol 显色物质定义为一个酶活力单位。

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

② 组织与细胞样本中组织蛋白酶(CatD)酶活计算公式:

定义：37°C 条件下，每克组织或细胞蛋白每分钟催化生成 1 μmol 显色物质定义为一个酶活力单位。

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

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，标准品按 F_2 值拟合)

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

ΔF：测定孔 $F_2 - F_1$

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

T：反应时间，10 min

附录1 关键数据

1.技术参数

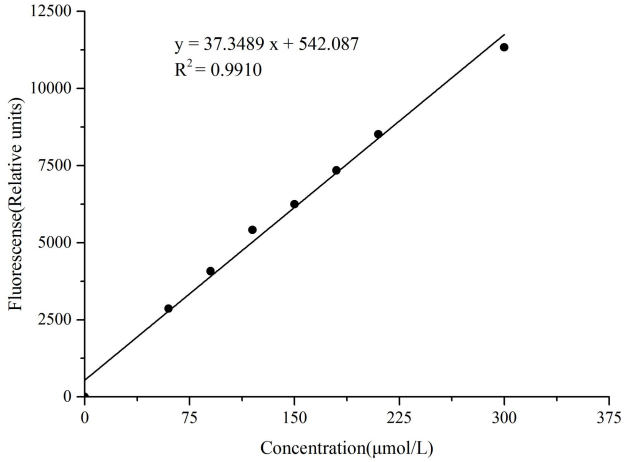
检测范围	0.02-30.00 U/L	**批间差**	3.6-4.7%
灵敏度	0.02 U/L	**批内差**	2.3-3.1%
稀释回收率	98-100%		

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 (μmol/L)	**0**	**60**	**90**	**120**	**150**	**180**	**210**	**300**
F_2值	1919	4650	5722	7473	8141	9187	10407	13170
	1758	4751	6111	7037	8031	9178	10297	13171
平均 F_2值	1838	4700	5917	7255	8086	9183	10352	13171
绝对 F_2值	0	2862	4078	5416	6247	7344	8514	11333

② 绘制标曲(如下图)：



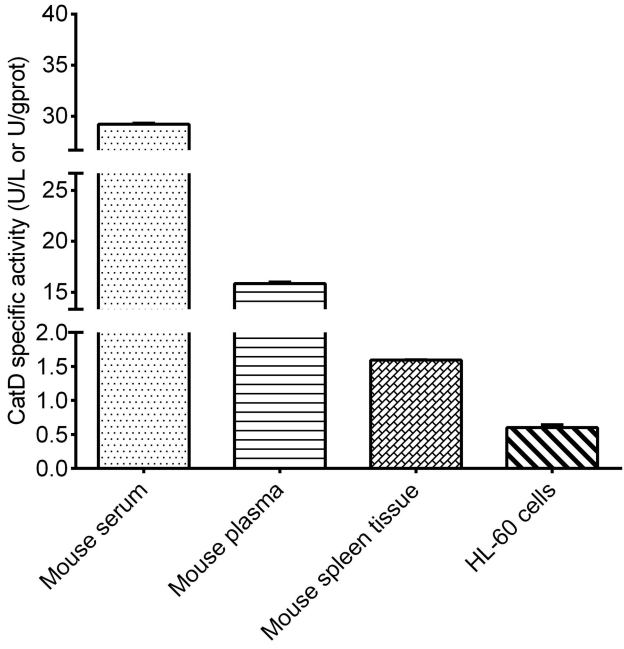
附录2 实例分析

例如小鼠脾脏组织(数据仅供参考)：

取20 μL 10%小鼠脾脏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 = 37.3489 x + 542.087，测定孔的F_1值为2372，F_2值为9928，$\Delta F = F_2 - F_1 = 9928 - 2372 = 7556$，10%小鼠脾脏组织匀浆蛋白浓度为11.78 gprot/L，计算结果为：

$$\text{CatD活力 (U/gprot)} = (7556 - 542.087) \div 37.3489 \div 11.78 \div 10 = 1.59 \text{ U/gprot}$$

按说明书操作，测定小鼠血清(加样量20 μL)、小鼠血浆(加样量20 μL)、小鼠脾脏组织样本(10%组织匀浆蛋白浓度11.78 gprot/L，加样量20 μL)、HL-60细胞(1×10^6个，蛋白浓度为2.18 gprot/L，加样量20 μL)中的CatD酶活(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。