

(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-F076

产品规格: 48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器: 荧光酶标仪(激发波长 325 nm, 发射波长 393 nm)

Elabscience® β -分泌酶 1(BACE 1)荧光法测试盒 **β -Secretase 1 (BACE 1) 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、血浆、组织及细胞样本中的 β -分泌酶 1(BACE 1)的活力。

检测原理

β -分泌酶 1(β -Secretase 1)是一种天冬氨酸蛋白酶，全称淀粉样前体蛋白 β 位点分裂酶 1(β -site amyloid precursor protein cleavage enzyme 1, BACE 1)。BACE 1 可以切割淀粉样蛋白前体蛋白(Amyloid precursor protein, APP)产生 40 或 42 个氨基酸的 β -淀粉样蛋白肽(Amyloid- β peptide, A β)。阿尔茨海默氏症患者大脑中 A β 在斑块和血管壁的沉积被普遍认为是导致该疾病的主要因素。

本试剂盒检测原理:采用荧光共振能量转移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)的方法。底物的两端分部着一个荧光供体基团和一个淬灭基团, 荧光能量由荧光供体向淬灭基团转移, 导致荧光供体分子自身的荧光强度衰减。当底物被 BACE 1 切割时, 底物的淬灭基团和荧光供体分开, 荧光供体不再被淬灭, 即可检测到荧光供体的荧光, 从而计算 BACE 1 的酶活。本试剂盒产生的荧光的最大激发波长为 325 nm, 最大的吸收波长为 393 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: 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)	15 mL×1 瓶	30 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	提取液 (Extraction Solution)	50 mL×1 瓶	50 mL×2 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 (Substrate)	0.25 mL×1 支	0.5 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	标准品 (Standard)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	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：荧光酶标仪(激发波长 325 nm，发射波长 393 nm)、37 °C 恒温箱

试剂：二甲亚砜(DMSO)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂四工作液的配制：

取一支试剂四加入 860 μ L DMSO 溶解混匀，避光待用，未使用完可分装后 -20 °C 避光保存 7 天。

③ 100 μ mol/L 标准品的配制：

将试剂四工作液:试剂一按体积比=1: 99 配制，避光待用，现配现用，1 h 内使用有效。

④ 工作液的配制：

将试剂三:试剂一按体积比=1: 31 配制，避光待用，现配现用。

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($\mu\text{mol/L}$)	0	20	30	40	60	70	80	100
100 $\mu\text{mol/L}$ 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

血清(浆)样本: 直接测定。

组织样本匀浆: 按照组织样本质量(g): 试剂二体积(mL) = 1: 9的比例匀浆, 4°C , $10000 \times g$ 离心10 min, 取上清, $2-8^{\circ}\text{C}$ 保存待测, 留取部分上清用于蛋白浓度测定。

细胞样本: 取 1×10^6 个细胞, 加入200 μL 试剂二匀浆, 4°C , $10000 \times g$ 离心10 min, 取上清液, $2-8^{\circ}\text{C}$ 保存待测, 留取部分上清用于蛋白浓度测定。

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: $0.003-4.75 \text{ U/L}$, 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	2-4	1.4×10^6 个 Jurkat 细胞	不稀释
10%小鼠肾组织	2-4	1.4×10^6 个 A549 细胞	不稀释
10%小鼠心组织	不稀释	1.6×10^6 个 293T 细胞	不稀释
10%小鼠脑组织	不稀释	1.4×10^6 个 CHO 细胞	不稀释
小鼠血浆	不稀释		

注: 稀释液为试剂二。

操作步骤

- ① 标准孔：取 10 μL 不同浓度的标准品溶液分别加入相应酶标孔中。
测定孔：取 10 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①中标准孔加入 120 μL 试剂一，向测定孔加入 120 μL 工作液。
- ③ 振板 5 s，使用荧光酶标仪检测测定孔激发波长 325 nm，发射波长 393 nm 的荧光值 F_1 。
- ④ 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min，使用荧光酶标仪检测标准孔和测定孔激发波长 325 nm，发射波长 393 nm 的荧光值 F_2 。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度的标准品溶液(μL)	10	--
待测样本(μL)	--	10
工作液(μL)	--	120
试剂一(μL)	120	--
振板 5 s，使用荧光酶标仪检测测定孔激发波长 325 nm，发射波长 393 nm 的荧光值 F_1 。37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min，使用荧光酶标仪检测标准孔和测定孔激发波长 325 nm，发射波长 393 nm 的荧光值 F_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 BACE 1 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。

$$\text{BACE 1 活力 (U/gprot)} = (\Delta F - b) \div a \div T \times f \div C_{pr}$$

② 血浆(清)样本中 BACE 1 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 的产物所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{BACE 1 活力 (U/L)} = (\Delta F - b) \div a \div T \times f$$

注解:

y: 标准品荧光值-空白荧光值(标准品浓度为 0 时的荧光值, 标准曲线以标准孔 F₂ 值进行拟合)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔF: 样本测定孔变化荧光值: F₂ - F₁

T: 反应时间 20 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

附录1 关键数据

1. 技术参数

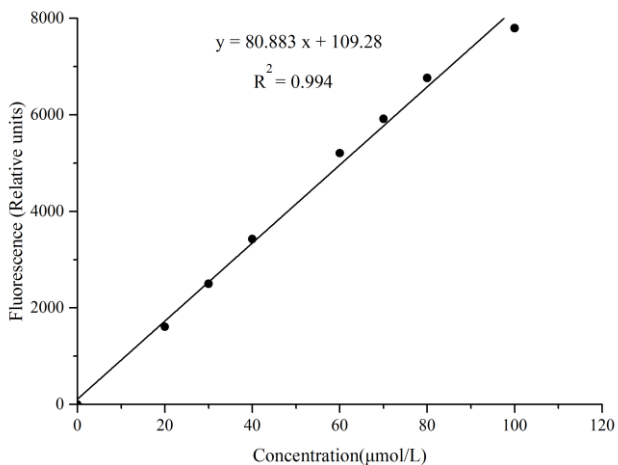
检测范围	0.003-4.75 U/L	批间差	4.7-10.4 %
灵敏度	0.003 U/L	批内差	2.2-3.2 %
稀释回收率	93.4-103.7 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量10 μL , 按照操作步骤进行实验, OD值如下表所示:

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	20	30	40	60	70	80	100
荧光值	58	1689	2525	3483	5166	6077	6823	7825
	47	1633	2581	3474	5354	5866	6816	7878
平均荧光值	53	1661	2553	3478	5260	5971	6819	7852
绝对荧光值	0	1609	2500	3426	5208	5919	6767	7799

② 绘制标曲(如下图):



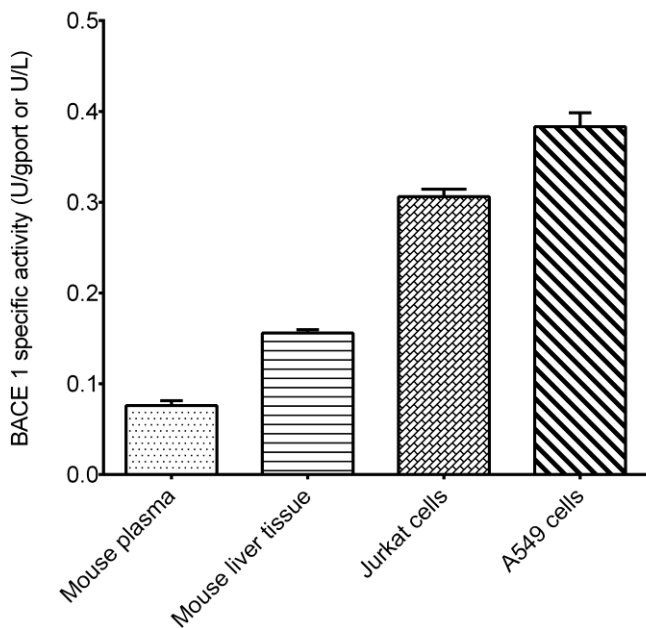
附录2 实例分析

例如小鼠肝组织(数据仅供参考):

取10 μL 稀释2倍的10 %小鼠肝组织匀浆加入到酶标板孔中, 按操作表操作, 结果如下: 测定孔荧光值 F_1 为483, F_2 为1551, $\Delta F = F_2 - F_1 = 1551 - 483 = 1068$, 测定出10%小鼠肝组织的蛋白含量为10.67 gprot/L, 标准曲线为 $y = 80.883x + 109.28$, 计算结果为:

$$\text{BACE 1活力(U/gprot)} = (1068 - 109.28) \div 80.883 \div 20 \times 2 \div 10.67 = 0.111 \text{ U/gprot}$$

按说明书操作, 测定大鼠血浆(加样量10 μL)、10%小鼠肝组织(蛋白浓度为10.67 gprot/L, 加样量10 μL)、Jurkat细胞(1.42×10^6 个, 蛋白浓度为0.71 gprot/L, 加样量10 μL)、A549细胞(1.48×10^6 个, 蛋白浓度为0.62 gprot/L, 加样量10 μL)中的BACE 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。

