

羧酸酯酶(CarE)活性检测试剂盒说明书

Carboxylesterase Assay Kit

微量法

货号: AK321

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK321-A	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK321-B	15mL×2 瓶	4℃保存;
AK321-C	粉剂×2 支	4℃保存;
AK321-D	粉剂×2 支	-20℃保存;

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 羧酸酯酶 (Carboxylesterase, CaEs, CarE, CE3.1.1.1) 是一个多基因家族, 其基因产物定位于多种组织的内质网中, 广泛分布于组织和器官中, 属于丝氨酸水解酶家族。羧酸酯酶能有效催化酯类和酰胺类化合物水解, 但不能催化水解乙酰胆碱及其类似物。CarE 与多种药物、环境毒物以及致癌物的解毒和代谢有关, 并且参与脂质运输和代谢。

原理: CarE 能催化乙酸-1-萘酯生成萘酯, 固蓝显色; 在 450 nm 光吸收增加速率, 计算 CarE 活性。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、低温离心机、水浴锅、研钵/匀浆器、可调式移液枪、无水乙醇和蒸馏水。

粗酶液提取:

1. 细菌、细胞样品制备

收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL AK321-A, 超声波破碎细菌或细胞 (功率 20%, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000g 4℃离心 30min, 取上清液置冰上待测。

2. 组织样品制备

按照组织质量 (g): AK321-A 体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK321-A) 进行冰浴匀浆; 12000g 4℃离心 30min, 取上清液置冰上待测。

3. 液体: 直接测定

测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长到 450 nm, 分光光度计蒸馏水调零。

2. 试剂配制:

- (1) 临用前取 1 支 AK321-C, 加 0.6ml 无水乙醇充分溶解;
- (2) 临用前取 1 支 AK321-D, 加少量 AK321-B 溶解;
- (3) 工作液配制: 临用前配制, 向 1 瓶 AK321-B 中, 加入溶解后的 AK321-C 和 AK321-D 各 1 支, 充分溶解, 过滤, 4℃避光保存, 可用 1 周。

3. 工作液在使用前 37℃预热 30min。

4. 在微量玻璃比色皿/96 孔板中依次加入:

试剂名称	空白管 (ul)	测定管 (ul)
蒸馏水	5	

样本		5
工作液	200	200
迅速混匀，于 450nm 处测定 3min 内吸光值变化，第 10s 吸光值记为 A1 测及 A1 空，37℃准确反应 3min；然后测定第 190s 吸光值，记为 A2 测及 A2 空。 △A 空白管=A2 空-A1 空，△A 测定管=A2 测-A1 测。		
注意：空白管只需测定 1-2 次。		

CarE 活性计算公式：

1. 组织中 CarE 活性

(1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义：每 mg 组织蛋白在 37℃反应体系中每分钟催化吸光值增加 1 定义为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{CarE 酶活 (U/mg prot)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 13.67 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

注：Cpr：蛋白质浓度，mg/mL；V 样：加入上清液体积，0.005 mL；T：反应时间，3min，V 反总：205μL=0.205mL；蛋白质浓度需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

(2) 按样本鲜重计算

活性单位定义：每 g 组织在 37℃反应体系中每分钟催化吸光值增加 1 定义为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{CarE 酶活 (U/g 鲜重)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反总} \times (V \text{ 样总} \div V \text{ 样}) \div W \div T \\ &= 13.67 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W\end{aligned}$$

注：V 样总：上清液总体积，1mL；V 样：加入上清液体积(mL)，0.005 mL；V 反总：205μL=0.205mL；W：样品质量 (g)；T：反应时间 (min)，3min。

2. 细菌或细胞中 CarE 活性

活性单位定义：每 1 万个细菌或细胞在 37℃反应体系中每分钟催化吸光值增加 1 定义为一个 CarE 活性单位。

$$\begin{aligned}\text{CarE 酶活(U/10}^4\text{cell)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反总} \times (V \text{ 样总} \div V \text{ 样}) \div \text{细胞密度(10}^4\text{ cell/mL)} \div T \\ &= 13.67 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞密度(10}^4\text{ cell/mL)}\end{aligned}$$

注：V 样总：上清液总体积，1 mL；V 样：加入上清液体积(mL)，0.005 mL；V 反总：205μL=0.205mL；T：反应时间 (min)，3min。

3. 液体中 CarE 活性

活性单位定义：每毫升样品在 37℃反应体系中每分钟催化吸光值增加 1 定义为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{CarE 酶活 (U/mL)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} \div T \\ &= 13.67 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管})\end{aligned}$$

注：V 样：加入上清液体积(mL)，0.005 mL；V 反总：205μL=0.205mL；T：反应时间 (min)，3min。