

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	50mL×1 瓶	4℃保存;
AK321-B	25mL×1 瓶	4℃避光保存(收货后一周内完成测定);

※ 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, 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, 固篮显色; 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、可调式移液枪和 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 200 万细菌或细胞加入 400μL 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, 蒸馏水调零。

2. AK321-B 使用前 37℃预热 30min。

3. 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	
AK321-B	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, 第 190s 吸光值记为 A2。△A 空白管=A2-A1		
上清液		5
AK321-B		200
迅速混匀, 于 450nm 处测定 3min 内吸光值变化, 第 10s 吸光值记为 A3, 第 190s 吸光值记为 A4。△A 测定管=A4-A3		

注意：空白管只需测定一次。

CarE 活性计算公式：

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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°C 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。

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

(2) 按样本鲜重计算

活性单位定义：每 g 组织在 37°C 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。

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

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°C 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。

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

3. 液体中 CarE 活性

活性单位定义：每毫升样品在 37°C 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。

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

注：V 反总：反应体系总体积，205 μ L=2.05 \times 10⁻⁴L；V 样总：上清液总体积，1 mL；V 样：加入上清液体积(mL)，0.005 mL；Cpr：蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量 (g)；T：反应时间 (min)，3min。

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

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°C 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。

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

(2) 按样本鲜重计算

活性单位定义：每 g 组织在 37°C 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。

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

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°C 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。

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

3. 液体中 CarE 活性

活性单位定义：每毫升样品在 37°C 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。

4. CarE 酶活 (U/mL) = (ΔA 测定管 - ΔA 空白管) $\times V$ 反总 $\div V$ 样 $\div T = 13.67 \times (\Delta A$ 测定管 - ΔA 空白管)

注： V 反总：反应体系总体积， $205\mu\text{L}=2.05\times 10^{-4}\text{L}$ ； V 样总：上清液总体积，1 mL； V 样：加入上清液体积(mL)，0.005 mL； Cpr：蛋白质浓度，mg/mL； W：样品质量(g)； T：反应时间(min)，3min。