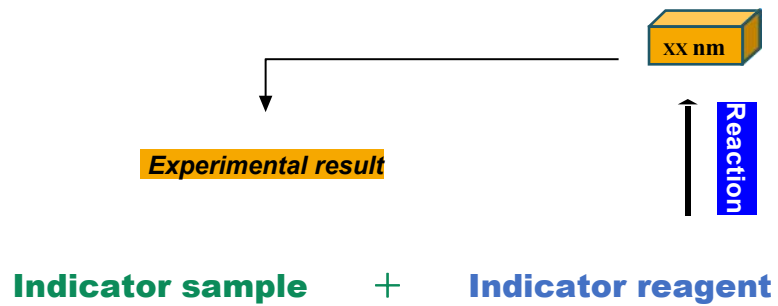


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

羧酸酯酶（CarE）活性测定试剂盒说明书

微量法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

哺乳动物 CarE，也称脂族酯酶（aliesterase），广泛分布于组织和器官，属于丝氨酸水解酶家族。CarE 催化含酯键、酰胺键和硫酸酯键的内源性与外源性物质水解，但不能催化水解乙酰胆碱及其类似物。CarE 参与脂质运输和代谢，并且与多种药物、环境毒物以及致癌物的解毒和代谢有关，有机磷农药可结合并且抑制 CarE 活性。

测定原理：

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

自备仪器和用品：

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。

试剂的组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体×1 瓶（棕色）	4℃避光保存	收货后一周内完成测定

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400 μL试剂一，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：按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL试剂一）进行冰浴匀浆；12000g 4℃离心 30min，取上清液待测。

3、液体：直接测定

测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长到450nm，蒸馏水调零。

2. 试剂二置于37℃水浴中预热30min。

3. 空白管：取微量玻璃比色皿/96孔板，依次加入5 μL蒸馏水和200 μL试剂二，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

4. 测定管：取微量玻璃比色皿/96孔板，依次加入5 μL上清液和200 μL试剂二，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

CarE 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。

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

(2) 按样本鲜重计算

CarE 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。

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

2 细菌或细胞中CarE活性

CarE 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。

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

3. 液体中 CarE 活性

CarE 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。

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

V反总: 反应体系总体积, 205 $\mu\text{L} = 2.05 \times 10^{-4}$ 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。

b. 使用96孔板测定的计算公式如下

1 组织中 CarE 活性

(3) 按蛋白浓度计算

CarE 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。

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

(4) 按样本鲜重计算

CarE 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。

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

2 细菌或细胞中 CarE 活性

CarE 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。

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

3. 液体中 CarE 活性

CarE 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

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

V反总: 反应体系总体积, 205 $\mu\text{L} = 2.05 \times 10^{-4}$ 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。