

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0387

Size: 100T/96S

羧酸酯酶 (CarE) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、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。

三、需自备的仪器和用品:

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。

四、试剂的组成和配置:

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

五、粗酶液提取：

● 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 μ L 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。

● 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。

● 液体：直接测定

六、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 μ L 蒸馏水和 200 μ L 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。 ΔA 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 μ L 上清液和 200 μ L 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。 ΔA 测定管=A4-A3

注意：空白管只需测定一次。

七、CarE 活性计算公式：

● 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， $205\ \mu\text{L}=2.05\times 10^{-4}\text{L}$ ；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。

● 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

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。

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

(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。

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 μL = $2.05 \times 10^{-4} \text{ L}$; 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。