

羧酸酯酶 (carboxylesterase, CarE) 活性测定试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

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, 固蓝显色; 在 450 nm 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、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、1mL 玻璃比色皿和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 50mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂二：液体 30mL×2 瓶, 4℃ 保存;

试剂三：粉剂×2 支, 4℃ 保存, 临用前取 1 支试剂三, 加 1.2ml 无水乙醇充分溶解;

试剂四：粉剂×2 支, -20℃ 保存, 临用前取 1 支试剂四, 加少量试剂二溶解;

工作液配制：临用前配制, 向 1 瓶试剂二中, 加入溶解后的试剂三和试剂四各 1 支, 充分溶解, 过滤, 4℃ 避光保存, 可用 1 周。

样本的前处理：

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 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。

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。

测定步骤：

1. 分光光度计预热 30min, 调节波长到 450 nm, 蒸馏水调零。

2. 试剂二置于 37℃ 水浴中预热 30 min。

3. 空白管：取 1mL 玻璃比色皿, 依次加入 5 μ L 蒸馏水和 1000 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 1mL 玻璃比色皿, 依次加入 5 μ L 上清液和 1000 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。

CarE 活性计算公式：

1 组织中 CarE 活性

(1) 按照蛋白浓度计算

单位的定义：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。

$$\begin{aligned}\text{CarE 酶活(U/mg prot)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 67 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

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: 1.005mL; 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) 按照样品质量计算

单位的定义: 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。

$$\begin{aligned}\text{CarE 酶活(U/g 鲜重)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反总} \times (V \text{ 样总} \div V \text{ 样}) \div W \div T \\ &= 67 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W\end{aligned}$$

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: 1.005mL;

W: 样品质量 (g); T: 反应时间 (min), 3min。

2 细菌或细胞中 CarE 活性

单位的定义: 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 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{CarE 酶活(U/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反总} \times (V \text{ 样总} \div V \text{ 样}) \div \text{细胞密度 (10}^4 \\ &\quad \text{cell/mL)} \div T \\ &= 67 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞密度 (10}^4 \text{ cell/mL)}\end{aligned}$$

V 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: 1.005mL ;

T: 反应时间 (min), 3min。

3. 液体中 CarE 活性

单位的定义: 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。

$$\begin{aligned}\text{CarE 酶活(U/mL)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样} \div T \\ &= 67 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管})\end{aligned}$$

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: 1.005mL;

T: 反应时间 (min), 3min。