

羧酸酯酶 (CarE) 活性测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

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 (alioesterase)，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，固篮显色；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/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。

试剂组成和配置：

试剂一：液体×1 瓶，4℃保存。

试剂二：液体 15mL×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 0.6ml 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。

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 400μL 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 450 nm，蒸馏水调零。

2. 工作液置于 37℃水浴中预热 30 min。

3. **空白管**：取微量玻璃比色皿/96 孔板，依次加入 5μL 蒸馏水和 200μL 工作液，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 5μL 上清液和 200μL 工作液，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：

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。

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

(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。

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

3. 液体中 CarE 活性

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。

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

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

(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。

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

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

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。

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

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。