

羧酸酯酶（CarE）活性测定说明书

（货号：G0908W 微板法 96 样）

一、产品简介：

羧酸酯酶（CarE，EC 3.1.1.1）是一种广泛分布于细胞胞液、线粒体和内质网的多聚蛋白，主要催化酯、硫酸酯和酰胺的水解，参与生物的解毒过程，被称为生物体内的清除剂。

羧酸酯酶催化乙酸-1-萘酯生成萘酚，进一步与固蓝显色剂反应生成有色物质，通过检测该有色物质在 450 nm 处的光吸收增加速率，进而得出羧酸酯酶（CarE）活性大小。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	提取液 110mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 mg×5 支	-20℃避光保存	每支使用前甩几下使试剂落入底部，再加 2mL 乙醇完全溶解备用，溶好的试剂可 -20 度分装保存，禁止反复冻溶且避光保存，变色（即由浅黄色变为褐色）即废弃。
试剂二	试剂 A：mg×2 支 试剂 B：空瓶×2 瓶	-20℃保存	每支使用前甩几下使试剂 A 落入底部，加 0.1mL 乙醇使试剂 A 完全溶解，再分别转移溶好的试剂 A 至一个试剂 B 空瓶中，接着再向试剂 B 瓶中加入 9.9mL 试剂三混匀作为试剂二备用。可 -20 度分装保存，禁止反复冻溶。
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、羧酸酯酶（CarE）活性检测：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。

③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	10	10
试剂一	30	30
蒸馏水		160
试剂二	160	

加入试剂二后立即开始计时, 37°C准确反应 3min 后在 450nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。

【注】: 1. 加完试剂二即启动反应, 所以试剂二加完需立即检测, 若 A 测定值大于 1.5 或 ΔA 大于 1, 可对样本进行稀释, 稀释倍数 D 需代入公式重新计算。

2. 试剂一和二可预先按照比例 30:160 混合 (用多少混合多少试剂量), 然后加完样本后直接加 190μL 混合液即可; 若加样本后再加试剂一出现浑浊沉淀, 则可预先使试剂一和二按照比例 30:160 混合 (用多少混合多少试剂量), 加完样本后直接加 190μL 混合液即可;

3. 若 ΔA 小于 0.005, 可增加样本量 V1 (如增至 30μL, 试剂二相应减少), 或延长反应时间 T (如由 3min 延长至 10min), 则改变后的 V1 和 T 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每分钟在反应体系中使 450nm 处吸光值增加 1 为一个酶活单位。

$$\text{CarE}(\Delta\text{OD}_{450}/\text{min/g 鲜重}) = \Delta A \div 1 \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 33.33 \times \Delta A \div W \times D$$

2、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟在反应体系中使 450nm 处吸光值增加 1 为一个酶活单位。

$$\text{CarE}(\Delta\text{OD}_{450}/\text{min/mg prot}) = \Delta A \div 1 \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \times D = 33.33 \times \Delta A \div \text{Cpr} \times D$$

3、按细胞数量计算:

酶活定义: 每 10^4 个细胞每分钟在反应体系中使 450nm 处吸光值 1 为一个酶活单位。

$$\text{CarE}(\Delta\text{OD}_{450}/\text{min}/10^4\text{cell}) = \Delta A \div 1 \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D = 0.067 \times \Delta A \times D$$

4、按液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟在反应体系中使 450nm 处吸光值增加 1 为一个酶活单位。

$$\text{CarE}(\Delta\text{OD}_{450}/\text{min/mL}) = \Delta A \div 1 \div V1 \div T \times D = 33.33 \times \Delta A \times D$$

V---加入提取液体积, 1 mL; V1---加入样本体积, 0.01mL;

T---反应时间, 3 min; W---样本质量, g;

D---稀释倍数, 若未稀释则值为 1;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的蛋白含量测定试剂盒。