

乙酰酯酶（Acetylase, AE）活性测定试剂盒说明书

（货号：G0718F 分光法 24 样）

一、产品简介：

乙酰酯酶（EC 3.1.1.6, AE）已被证明是消除饲料细胞壁中阿魏酸等酚酸类木质素的关键酶。可与其他细胞壁降解酶协同作用共同促进饲料等细胞壁的降解。

本试剂盒采用乙酰酯酶（AE）分解底物对-硝基苯乙酯生成对-硝基苯酚（PNP），后者在 405nm 有最大吸收峰，通过测定吸光值升高速率来计算乙酰酯酶（AE）活性。

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	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×2 支	4℃保存	临用前每支加 0.7mL 无水乙醇混匀溶解，仍 4℃保存。
试剂三	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉体×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、蒸馏水。

四、乙酰酯酶（AE）活性测定：

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：取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，4℃×12000rpm 离心 15min，取上清液待测。

【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（ 10^4 ）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：可直接测定，或者适当稀释后测定。若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 可见分光光度计预热 30 min，调节波长为 405nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂于 25℃水浴中预热 10 min。

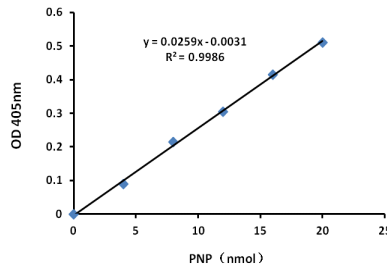
③ 在 EP 管中依次加入下列试剂：

试剂名称（ μ L）	测定管	对照管
样本	100	100
试剂一	460	500
试剂二	40	
混匀，40℃孵育 30min。		
试剂三	100	100
混匀，取全部上清液至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中（若有浑浊可 8000rpm 离心 5min 后取上		

清), 于 405nm 读取 A 值, $\Delta A = A$ 测定 - A 对照 (每个样本做一个自身对照)。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 0.0259x - 0.0031$, x 是 PNP 摩尔质量 (nmol); y 是 ΔA 。



2、按照样本质量计算:

酶活定义: 每克组织每分钟水解底物产生 1nmol PNP 定义为一个酶活单位。

$$AE \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0031) \div 0.0259] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 12.9 \times (\Delta A + 0.0031) \div W \times D$$

3、按照样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克蛋白每分钟水解底物产生 1nmol PNP 定义为一个酶活单位。

$$AE \text{ (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0031) \div 0.0259] \div (Cpr \times V1) \div T \times D = 12.9 \times (\Delta A + 0.0031) \div Cpr \times D$$

4、按细菌/细胞数量计算:

酶活定义: 每 10^4 个细胞每分钟水解底物产生 1nmol PNP 定义为一个酶活单位。

$$AE \text{ (nmol/min/} 10^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0031) \div 0.0259] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D = 0.03 \times (\Delta A + 0.0031) \times D$$

5、按液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟水解底物产生 1nmol PNP 定义为一个酶活单位。

$$AE \text{ (nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0031) \div 0.0259] \div V1 \div T = 12.9 \times (\Delta A + 0.0031)$$

W---样品质量, g;

V---提取液体积, 1 mL;

V1---上清液体积 (mL), 0.1mL;

T---反应时间, 30 min.

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

500---细胞数量, 万;

Cpr---上清液蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (10 μ mol/mL): 向标准品 EP 管里面加入 1.4mL 蒸馏水超声溶解。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.2 μ mol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据对照管的加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。