

羧酸酯酶（CarE）活性测定说明书

（货号：G0908F 分光法 48 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、试剂盒的组分和配制：

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|------|------------------------------|----------|---|
| 提取液 | 提取液 60mL×1 瓶 | 4℃保存 | |
| 试剂一 | 粉体 mg×5 支 | -20℃避光保存 | 每支用前用几下使试剂落入底部，再加 3.5mL 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×3 支 试剂 B: 空瓶×3 瓶 | -20℃保存 | 每支用前用几下使试剂 A 落入底部，加 0.135mL 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 13.2mL 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 45mL×1 瓶 | 4℃保存 | |

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）、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 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 450nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。

③ 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 对照管 |
|-----------|-----|-----|
| 样本 | 40 | 40 |
| 试剂一 | 120 | 120 |
| 蒸馏水 | | 640 |
| 试剂二 | 640 | |

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)。

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。

$$\text{CarE}(\Delta\text{OD}_{450}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = \Delta A \div 1 \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 8.33 \times \Delta A \div W \times D$$

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。

$$\text{CarE}(\Delta\text{OD}_{450}/\text{min}/\text{mg prot}) = \Delta A \div 1 \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \times D = 8.33 \times \Delta A \div \text{Cpr} \times D$$

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。

$$\text{CarE}(\Delta\text{OD}_{450}/\text{min}/10^4\text{cell}) = \Delta A \div 1 \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D = 0.017 \times \Delta A \times D$$

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。

$$\text{CarE}(\Delta\text{OD}_{450}/\text{min}/\text{mL}) = \Delta A \div 1 \div V1 \div T \times D = 8.33 \times \Delta A \times D$$

V---加入提取液体积, 1 mL; V1---加入样本体积, 0.04mL;

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。