

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。

自备实验用品及仪器：

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°C保存。

试剂二：液体15mL×2瓶，4°C保存；

试剂三：粉剂×2支，4°C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°C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°C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°C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°C离心30min，取上清液待测。

3、液体：直接测定

羧酸酯酶（CarE）活性测定试剂盒说明书测定操作：

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. 试剂二置于37°C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：取微量玻璃比色皿/96孔板，依次加入5μL上清液和200μL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：

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 $\times 10^{-4}$ 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。

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。

CarE酶活(U/10⁴ cell)=(ΔA 测定管- ΔA 空白管)×V反总×(V样总÷V样)÷细胞密度(10⁴ cell/mL)÷T=13.67×(ΔA 测定管- ΔA 空白管)÷细胞密度(10⁴ 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。

CarE酶活(U/mL)=(ΔA 测定管- ΔA 空白管)×V反总÷V样÷T
=13.67×(ΔA 测定管- ΔA 空白管)

V反总：反应体系总体积，205 μ L=2.05×10⁻⁴L；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。