

## 羧酸酯酶 (CarE) 活性测定试剂盒说明书

### 微量法 100T/96S

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

#### 测定意义:

哺乳动物 CarE, 也称脂族酯酶 (alicyclase), 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。

#### 组成:

产品名称	ES004-100T/96S	Storage
试剂一: 液体	1 瓶	4°C
试剂二: 液体	15ml×2	4°C
试剂三: 粉剂	2 支	4°C
试剂四: 粉剂	2 支	-20°C
说明书	一份	

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。

#### 自备仪器和用品:

可见分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1 ml 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

#### 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

### 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。△A 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。△A 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。

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

##### 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, 205μl=2.05×10<sup>-4</sup>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。

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

## 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 $\mu$ l=2.05 $\times$ 10<sup>-4</sup>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。

