

羧酸酯酶活性测定试剂盒说明书(精简版)

(货号: A133-1-1 Carboxylesterase, 分光光度法 50T/48样)

一、测定意义

哺乳动物羧酸酯酶 (CarE) 广泛分布于组织和器官中, 大部分的羧酸酯酶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和外源性物质的水解, 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。

二、测定原理

CarE能催化乙酸-1-萘酯生成萘酯, 固蓝显色, 在450nm检测光吸收速率来监测萘酯生成速率, 从而计算CarE活性。

三、自备仪器用品

可见分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调式移液器枪、1mL玻璃比色皿、无水乙醇和蒸馏水。

四、试剂组成和配制 (未开封产品3个月内有效)

试剂一: 液体50mL×1 瓶, 4℃保存

试剂二: 液体30mL×2 瓶, 4℃保存

试剂三: 粉剂×2支, 4℃保存, 临用前取1支试剂三加1.2mL无水乙醇充分溶解

试剂四: 粉剂×2支, -20℃保存

工作液配制: 临用前取试剂二1瓶, 取少量试剂二加入到1支试剂四中溶解, 然后把溶解的1支试剂四和1支试剂三加入到该瓶试剂二中, 混匀充分, 过滤, 4℃避光保存, 可用1周。

五、样本前处理

- 1、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在4℃离心30分钟, 取上清液待测。
- 2、按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)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℃离心30分钟, 取上清液待测。
- 3、液体样本: 直接取样。

六、测定步骤

1. 分光光度计预热30min 以上, 调节波长到450nm, 用蒸馏水调零。
2. 工作液在37℃中预热30min 以上。
3. 空白管: 依次在1mL 玻璃比色皿中依次加入5μL蒸馏水, 1000μL预热的工作液, 迅速混匀后在450nm测定10s和190s光吸收A₁ 和A₂, ΔA_{空白管}=A₂-A₁。注意: 空白管只需做1-2次。
4. 测定管: 依次在1mL 玻璃比色皿中依次加入5μL上清液, 1000μL预热的工作液, 迅速混匀后在450nm测定10s和190s光吸收A₃ 和A₄, ΔA_{测定管}=A₄-A₃。

七、CarE活性计算

1. 组织中CarE活性

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位定义: 每毫克组织蛋白在37℃每分钟催化吸光值增加1, 定义为1U。

$$\begin{aligned} \text{CarE活力} &= \frac{(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{反应}}}{\text{Cpr} \times V_{\text{样}}} \div T \\ (\text{U/mgprot}) &= 67 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

单位定义: 每克组织在37℃每分钟催化吸光值增加1, 定义为1U。

$$\begin{aligned} \text{CarE活力} &= \frac{(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{反应}}}{W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}} \div T \\ (\text{U/g}) &= 67 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W \end{aligned}$$

2. 细胞或细菌中CarE活性

单位定义: 每1万个细胞或细菌在37℃每分钟催化吸光值增加1, 定义为1U。

$$\begin{aligned} \text{CarE活力} &= \frac{(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{反应}}}{(\text{U}/10^4 \text{ cells}) \times \text{细胞密度} \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}} \div T \\ (\text{U}/10^4 \text{ cells}) &= 67 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \text{细胞密度} \end{aligned}$$

3. 液体样本中CarE活性

单位定义: 每mL样本在37℃每分钟催化吸光值增加1, 定义为1U。

$$\begin{aligned} \text{CarE活力} &= \frac{(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{反应}}}{(\text{U/mL}) \times V_{\text{样}}} \div T \\ (\text{U/mL}) &= 67 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \end{aligned}$$

V_{样总}: 上清液总体积, 1mL。

V_样: 加入上清液体积, 0.005mL。

V_{反应}: 反应体系总体 (L), 1.005mL;

W: 样本质量, (g)

T: 催化反应时间 (min), 3 min。

Cpr: 上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定, 建议使用本所BCA 蛋白质含量测定试剂盒;

细胞密度: 用10⁴ cells/mL表示。