

羧酸酯酶（CarE）活性检测试剂盒说明书

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

可见分光光度法

货号：AC10204

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体60mL×1瓶	2-8°C保存
试剂一	粉剂×2瓶	2-8°C保存
试剂二	粉剂×2瓶	-20°C保存
试剂三	液体70mL×1瓶	2-8°C保存

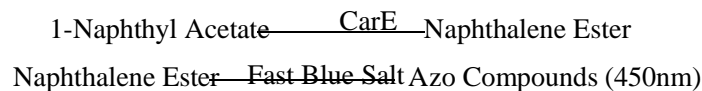
溶液的配制：

- 1、试剂一：临用前取1瓶先加入1.25mL无水乙醇，震荡使其大部分溶解，再加入8.75mL试剂三，震荡至充分溶解，用不完的试剂2-8°C保存一周。
- 2、试剂二：临用前取1瓶试剂二中加入18mL试剂三，震荡使其充分溶解。本试剂溶解后为淡黄色，且在常温下不稳定，建议根据样本量取适当配好的试剂二置于冰上待用，剩余试剂分装后置于-20°C保存一周，禁止反复冻融。

产品说明：

哺乳动物 CarE，也称脂族酯酶（aliesterase），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。

CarE 能催化乙酸-1-萘酯生成萘酯，固蓝显色；在 450nm 光吸收增加速率，计算 CarE 活性。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL玻璃比色皿、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、研钵/匀浆器、超声破碎仪，蒸馏水和无水乙醇。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

细菌或培养细胞：先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提取液，超声波破碎细胞（功率20%，超声3s，间隔10s，重复30次）；然后15000rpm，4°C，离心10min，取上清（若上清不够澄清，建议重复上述离心步骤），置于冰上待检。

组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液），进

行冰浴匀浆。15000rpm, 4°C, 离心10min, 取上清(若上清不够澄清, 建议重复上述离心步骤), 置于冰上待检。

血清: 直接测量。(若样品浑浊, 可离心后取上清测定)

二、测定步骤

- 1、分光光度计预热30min以上, 调节波长至450nm, 蒸馏水调零。
- 2、试剂一置于37°C水浴中预热10 min以上, 试剂二在检测过程中需置于冰上待用。
- 3、在玻璃比色皿中进行如下操作:

加入试剂(μL)	空白管	测定管
蒸馏水	50	-
上清液/血清	-	50
试剂二	600	600
试剂一	350	350

将上述试剂按照先后顺序分别加入比色皿中, 加入试剂一即开始计时, 迅速吹打混匀, 测定第10s的吸光值记为A1空和A1测, 迅速将比色皿连同反应液一起放入37°C水浴中准确反应5min, 之后迅速取出比色皿并擦干, 记录310s时的吸光度记为A2空、A2测。计算 $\Delta A_{\text{空白管}} = A2_{\text{空}} - A1_{\text{空}}$, $\Delta A_{\text{测定管}} = A2_{\text{测}} - A1_{\text{测}}$ 。(空白管只需做1~2次)

三、CarE活性计算

1. 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 37°C下, 每mL反应体系每mg组织蛋白每分钟催化吸光值增加1定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{CarE酶活(U/mg prot)} &= (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{反总}} \div 1 \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F \\ &= 4 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div C_{\text{pr}} \times F \end{aligned}$$

2. 按样本质量计算:

单位的定义: 37°C下, 每mL反应体系每g组织每分钟催化吸光值增加1定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{CarE酶活(U/g 质量)} &= (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{反总}} \div 1 \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F \\ &= 4 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W \times F \end{aligned}$$

3. 按细菌或细胞数量计算:

单位的定义: 37°C下, 每mL反应体系每1万个细菌或细胞每分钟催化吸光值增加1定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{CarE酶活(U/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{反总}} \div 1 \div (200 \div V_{\text{细胞样总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F \\ &= 0.008 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \times F \end{aligned}$$

4. 按血清体积计算:

单位的定义: 37°C下, 每mL反应体系每mL血清每分钟催化吸光值增加1定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{CarE酶活(U/mL)} &= (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{反总}} \div 1 \div V_{\text{血清}} \div T \times F \\ &= 4 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \times F \end{aligned}$$

V样总: 上清液总体积, 1mL; V样: 加入样本体积, 0.05mL; T: 反应时间, 5min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 200: 细菌或细胞总数, 200万; V细胞样总: 细胞中加入的提取液体积, 0.4mL; V血清: 加入血清体积, 0.05mL; V反总: 反应体系总体积, 1mL; F: 稀释倍数。

注意事项:

- 1、试剂二为-20°C储存试剂, 在常温下不稳定, 一般常温放置2-3小时后即可明显发现液体由浅黄色变为浅褐色

(液体变褐色视为变质,不可用)。建议试验前根据样本量计算所需试剂二的用量,在试剂二溶解后,留取所需用量置于冰上待用,剩余试剂可分装后-20℃储存。

- 2、动物组织样本一般稀释 8 倍或更大稀释倍数后进行操作测定。
- 3、当吸光值大于 1 时,建议将样本用蒸馏水稀释后测量。计算公式注意乘以稀释倍数。
- 4、建议反应时保持 37℃的环境,且逐一比色。

实验实例:

- 1、取 0.1g 小鼠肝脏加入 1mL 提取液进行匀浆研磨,取上清用蒸馏水稀释 32 倍后按照测定步骤操作,用玻璃比色皿测得计算 ΔA 空白管=A2 空-A1 空=0.202-0.140=0.062, ΔA 测定管=A2 测-A1 测=0.959-0.185=0.774,按样本质量计算酶活得:

CarE 酶活(U/g 质量)= $4 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W \times F = 4 \times (0.774 - 0.062) \div 0.1 \times 32 = 911.36 \text{ U/g 质量}$ 。

- 2、取 0.1g 小鼠肾脏加入 1mL 提取液进行匀浆研磨,取上清用蒸馏水稀释 8 倍后按照测定步骤操作,用玻璃比色皿测得计算 ΔA 空白管=A2 空-A1 空=0.202-0.140=0.062, ΔA 测定管=A2 测-A1 测=0.586-0.231=0.355,按样本质量计算酶活得:

CarE 酶活(U/g 质量)= $4 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W \times F = 4 \times (0.355 - 0.062) \div 0.1 \times 8 = 93.76 \text{ U/g 质量}$ 。

- 3、取马血清用蒸馏水稀释 8 倍后按照测定步骤操作,用玻璃比色皿测得计算 ΔA 空白管=A2 空-A1 空=0.202-0.140=0.062, ΔA 测定管=A2 测-A1 测=0.621-0.130=0.491,计算酶活得:

CarE 酶活(U/mL)= $4 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times F = 4 \times (0.491 - 0.062) \times 8 = 13.728 \text{ U/mL 质量}$ 。