

## 羧酸酯酶（CarE）活性检测试剂盒说明书

微量法

**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。**

货号：AC10205

规格：100T/96S

**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 100 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂三	液体 30 mL×1 瓶	4°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂一：临用前先加入 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
- 2、试剂二：临用前取 16 mL 试剂三加入试剂二瓶中震荡使其充分溶解，临用前配制。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，禁止反复冻融。

**产品说明：**

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/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、研钵/匀浆器、蒸馏水。

**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。

## 二、测定步骤

- 1、分光光度计/酶标仪预热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、在微量玻璃比色皿或96孔板中进行如下操作：

加入试剂 (μL)	空白管	测定管
蒸馏水	10	-
上清液/血清	-	10
试剂二	120	120
试剂一	70	70

将上述试剂按照先后顺序分别加入微量比色皿或 96 孔板中，加入试剂一即开始计时，迅速混匀后，测定第 10s 的吸光值记为 A1 空和 A1 测，37°C条件下准确反应 5min，测定 310s 的吸光值，记为 A2 空、A2 测。计算  $\Delta A$  空白管=A2 空-A1 空， $\Delta A$  测定管=A2 测-A1 测。（空白管只需做 1~2 次）

（**注意：**本试剂盒反应时应保持 37°C 的环境，一般酶标仪有控温功能，可直接设置成 37°C，待温度上升至 37°C 后即可开始试验；若用没有控温装置的分光光度计，则可以用恒温水浴锅辅助反应，具体操作如下：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，记录第 10s 的吸光值 A1，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 A2，计算  $\Delta A=A2-A1$ 。）

## 三、CarE 活性计算

### A、使用微量玻璃比色皿测定的计算公式

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。

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

V<sub>样总</sub>: 上清液总体积, 1mL; V<sub>样</sub>: 加入样本体积, 0.01mL; T: 反应时间, 5min; C<sub>pr</sub>: 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<sub>细胞样总</sub>: 细胞中加入的提取液体积, 0.4mL; V<sub>血清</sub>: 加入血清体积, 0.01mL; V<sub>反总</sub>: 反应体系总体积, 0.2mL; F: 稀释倍数。

## B、使用96孔板测定的计算公式

### 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0.5定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{CarE酶活(U/mg prot)} &= (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{反总}} \div 0.5 \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \times F \\ &= 8 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{Cpr} \times F\end{aligned}$$

### 2. 按样本质量计算:

单位的定义: 37°C下, 每mL反应体系每g组织质量每分钟催化吸光值增加0.5定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{CarE酶活(U/g 质量)} &= (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{反总}} \div 0.5 \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F \\ &= 8 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W \times F\end{aligned}$$

### 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0.5定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{CarE酶活(U/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{反总}} \div 0.5 \div (200 \div V_{\text{细胞样总}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F \\ &= 0.016 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \times F\end{aligned}$$

### 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0.5定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{CarE酶活(U/mL)} &= (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \times V_{\text{反总}} \div 0.5 \div V_{\text{血清}} \div T \times F \\ &= 8 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \times F\end{aligned}$$

V样总: 上清液总体积, 1mL; V样: 加入样本体积, 0.01mL; 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, 0.01mL; V反总: 反应体系总体积, 0.2mL; 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°C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, 建议将样本稀释后测量。计算公式注意乘以稀释倍数。
- 4、为保证反应时间的准确性, 建议逐一比色; 如想用 96 孔板对多样本同时检测, 建议使用排枪, 且一次最多 8 个或 12 个孔(8 道排枪或 12 道排枪)。

## 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 96 孔板测得计算  $\Delta A_{\text{空白管}} = A2_{\text{空}} - A1_{\text{空}} = 0.148 - 0.122 = 0.026$ ,  $\Delta A_{\text{测定管}} = A2_{\text{测}} - A1_{\text{测}} = 0.457 - 0.118 = 0.339$ , 按样本质量计算酶活得:

$$\text{CarE 酶活(U/g 质量)} = 8 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W \times F = 8 \times (0.339 - 0.026) \div 0.1 \times 32 = 801.28 \text{ U/g 质量。}$$

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 96 孔板测得计算  $\Delta A$  空白管=A2 空-A1 空=0.148-0.122=0.026， $\Delta A$  测定管=A2 测-A1 测=0.28-0.124=0.156，按样本质量计算酶活得：

CarE 酶活(U/g 质量)= $8 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times F = 8 \times (0.156 - 0.026) \div 0.1 \times 8 = 83.2 \text{ U/g 质量}$ 。