

羧酸酯酶（CarE）活性测定说明书

（微板法 96 样）

一、产品简介：

羧酸酯酶（CarE，EC 3.1.1.1）是一种广泛分布于细胞胞液、线粒体和内质网的多聚蛋白，主要催化酯、硫酸酯和酰胺的水解，参与生物的解毒过程，被称为生物体内的清除剂。

羧酸酯酶催化乙酸-1-萘酯生成萘酚，进一步与固蓝显色剂反应生成有色物质，通过检测该有色物质在 450 nm 处的光吸收增加速率，进而得出羧酸酯酶（CarE）活性大小。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	提取液 110mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉体 mg×4 支	-20°C保存	每支用前甩几下使试剂落入底部，再加 2mL 乙醇完全溶解备用，溶好的试剂可-20 度分装保存，禁止反复冻溶，变色即废弃。
试剂二	试剂 A: mg×2 支 试剂 B: 空瓶×2 瓶	-20°C保存	每支用前甩几下使试剂 A 落入底部，加 0.1mL 乙醇使试剂 A 完全溶解，再全部转移溶好的试剂 A 至一个试剂 B 空瓶中，接着再向试剂 B 瓶中加入 9.9mL 试剂三混匀作为试剂二备用。可-20 度分装保存，禁止反复冻溶。
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、羧酸酯酶（CarE）活性检测：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。4°C×12000rpm 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。

② 所有试剂解冻至室温（25°C）。

③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	10	10
试剂一	30	30
蒸馏水		160
试剂二	160	
加入试剂二后立即开始计时, 37°C准确反应 3min 后在 450nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{测定} - A_{对照}$ (每个样本做一个自身对照)。		

- 【注】：1. 加完试剂二即启动反应，所以试剂二加完需**立即**检测，若 A 测定值大于 1.5 或 ΔA 大于 1，可对样本进行稀释，稀释倍数 D 需代入公式重新计算。
2. 试剂一和二可预先按照比例 30:160 混合（用多少混合多少试剂量），然后加完样本后直接加 190μL 混合液即可；若加样本后再加试剂一出现浑浊沉淀，则可预先使试剂一和二按照比例 30:160 混合（用多少混合多少试剂量），加完样本后直接加 190μL 混合液即可；
3. 若 ΔA 小于 0.005，可增加样本量 V1（如增至 30μL，试剂二相应减少），或延长反应时间 T（如由 3min 延长至 10min），则改变后的 V1 和 T 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟在反应体系中使 450nm 处吸光值增加 1 为一个酶活单位。

$$\text{CarE}(\Delta\text{OD}_{450}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = \Delta A \div 1 \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 33.33 \times \Delta A \div W \times D$$

2、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟在反应体系中使 450nm 处吸光值增加 1 为一个酶活单位。

$$\text{CarE}(\Delta\text{OD}_{450}/\text{min}/\text{mg prot}) = \Delta A \div 1 \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \times D = 33.33 \times \Delta A \div \text{Cpr} \times D$$

3、按细胞数量计算：

酶活定义：每 10^4 个细胞每分钟在反应体系中使 450nm 处吸光值 1 为一个酶活单位。

$$\text{CarE}(\Delta\text{OD}_{450}/\text{min}/10^4\text{cell}) = \Delta A \div 1 \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D = 0.067 \times \Delta A \times D$$

4、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟在反应体系中使 450nm 处吸光值增加 1 为一个酶活单位。

$$\text{CarE}(\Delta\text{OD}_{450}/\text{min}/\text{mL}) = \Delta A \div 1 \div V1 \div T \times D = 33.33 \times \Delta A \times D$$

V---加入提取液体积，1 mL； V1---加入样本体积，0.01mL；

T---反应时间，3 min； W---样本质量，g；

D---稀释倍数，若未稀释则值为 1；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的蛋白含量测定试剂盒。