

## 阿魏酸酯酶（Feruloyl esterase, FAE）活性测定试剂盒说明书

（货号：ADS-F-FAE002 分光法 48 样）

### 一、产品简介：

阿魏酸酯酶(FAE, EC 3.1.1.73)又称肉桂酸酯酶或肉桂酸水解酶, 是一种胞外羧酸酯酶, 阿魏酸酯酶主要降解细胞壁多糖或果胶中阿拉伯糖或半乳糖或羟基肉桂酸之间的酯键。

阿魏酸酯酶(FAE) 催化底物阿魏酸对硝基苯酯分解生成对-硝基苯酚 (PNP), 后者在 405nm 有最大吸收峰, 通过测定吸光值升高速率来计算阿魏酸酯酶(FAE) 活性。

### 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	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 2 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加 1mL 无水乙醇混匀溶解, 静置一分钟后, 取上清液测定。
标准品	粉体 1 支	4℃保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

### 三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、蒸馏水。

### 四、阿魏酸酯酶（FAE）活性测定：

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：取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，4℃×12000rpm 离心 15min，取上清液待测。

【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℃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（10<sup>4</sup>）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

- ③ 液体样本：可直接测定，或者适当稀释后测定。若浑浊，离心后取上清检测。

#### 2、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30 min，调节波长为 405nm。
- ② 所有试剂于 25℃水浴中预热 10 min。
- ③ 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入下列试剂：

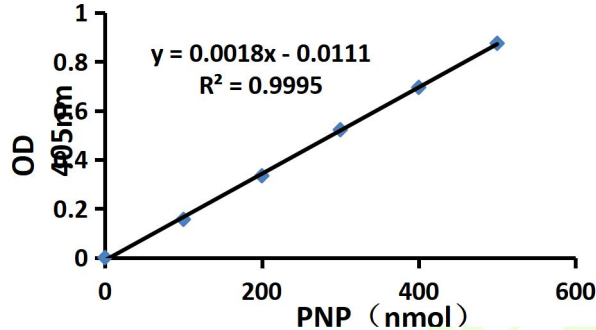
试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	测定管
样本	100
试剂一	560
试剂二	40
混匀，立即于 405nm 处读取吸光值 A1，40℃孵育 30min 后读取 A2。 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】：① 若  $\Delta A$  值小于 0.01，可延长反应时间 T（如增至 60min 或更长），或增加样本量 V1（如增至 200 $\mu\text{L}$ ，则试剂一相应减少），则重新调整的 V1 和 T 代入公式重新计算。

- ② 若 A1 的值超过 1.5, 可减少样本量 V1 (如减至 50 $\mu$ L, 则试剂一相应增加), 则调整后的 V1 代入公式重新计算。

## 五、结果计算:

1、标准曲线:  $y = 0.0018x - 0.0111$ , x 是标准品 (PNP) 摩尔质量 (nmol); y 是  $\Delta A$ 。



2、按照样本质量计算:

酶活定义: 每克组织每分钟水解底物生成 1nmol 的 PNP 定义为一个酶活单位。

$$\text{FAE (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0111) \div 0.0018] \div (W \times V1 \div V) \div T = 185.2 \times (\Delta A + 0.0111) \div W$$

3、按照样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克蛋白每分钟水解底物生成 1nmol 的 PNP 定义为一个酶活单位。

$$\text{FAE (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0111) \div 0.0018] \div (Cpr \times V1) \div T = 185.2 \times (\Delta A + 0.0111) \div Cpr$$

4、按细菌/细胞数量计算:

酶活定义: 每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟水解底物生成 1nmol 的 PNP 定义为一个酶活单位。

$$\text{FAE (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0111) \div 0.0018] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 185.2 \times (\Delta A + 0.0111) \div 500$$

5、按液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟水解底物生成 1nmol 的 PNP 定义为一个酶活单位。

$$\text{FAE (nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0111) \div 0.0018] \div V1 \div T = 185.2 \times (\Delta A + 0.0111)$$

W---样品质量, g;

V---提取液体积, 1 mL;

V1---上清液体积 (mL), 0.1mL;

T---反应时间, 30 min。

500---细胞数量, 万;

Cpr---上清液蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (10 $\mu$ mol/mL): 向标准品 EP 管里面加入 1ml 蒸馏水溶解。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 1, 2, 3, 4, 5  $\mu$ mol/ml。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照 50 $\mu$ L 标准品+150 $\mu$ L 试剂一测定, 于 405nm 处读取 A 值, 根据结果即可制作标准曲线。