

羧酸酯酶（CarE）活性测定说明书

（货号：ADS-W-ZM004 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	提取液 110mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 5 支	-20℃避光保存	每支： 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 2mL 乙醇完全溶解备用，溶好的试剂可-20 度分装保存，禁止反复冻溶且避光保存，变色（即由浅黄色变为褐色）即废弃。
试剂二	试剂 A：2 支 试剂 B：空瓶×2 瓶	-20℃避光保存	每支： 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂 A 落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加 0.1mL 乙醇使试剂 A 完全溶解； 3. 再分别转移溶好的试剂 A 至一个试剂 B 空瓶中； 4. 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； 5. 可-20 度分装保存，禁止反复冻溶。
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、羧酸酯酶（CarE）活性检测：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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℃×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℃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（ 10^4 ）：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、检测步骤：

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℃）。

③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（ 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℃准确反应 3min 后在 450nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （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 190 μL 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 190 μL 混合液即可；

3. 若 ΔA 小于 0.005，可增加样本量 V1（如增至 30 μL ，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。