羧酸酯酶（carboxylesterase，CarE）活性测定试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

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。

测定原理：

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

自备仪器和用品：

可见分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、1mL 玻璃比色皿和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 50mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：液体 30mL×2 瓶， 4℃保存；

试剂三：粉剂×2 支， 4℃保存，临用前取 1 支试剂三，加 1.2ml 无水乙醇充分溶解；

试剂四：粉剂×2 支，-20℃保存，临用前取 1 支试剂四，加少量试剂二溶解；

工作液配制：临用前配制，向 1 瓶试剂二中，加入溶解后的试剂三和试剂四各 1 支，充分溶解，**过滤**，4℃避光保存，可用 1 周。

样本的前处理：

1、细菌、细胞样品制备

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 试剂一，超声波破碎细菌或细胞（功率 20%，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000g 4℃离心 30min，取上清液待测。

2、组织：按照组织质量（g）：试剂一体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）进行冰浴匀浆；12000g 4℃离心 30min，取上清液待测。

3、液体：直接测定。

测定步骤：

1. 分光光度计预热 30min，调节波长到 450 nm，蒸馏水调零。

2. 试剂二置于 37℃水浴中预热 30 min。

3. 空白管：取 1mL 玻璃比色皿，依次加入 **5μL 蒸馏水**和 1000μL 试剂二，迅速混匀，于 450nm 处测定 3min 内吸光值变化，第 10s 吸光值记为 A1，第 190s 吸光值记为 A2。**△A 空白管=A2-A1**

4. 测定管：取 1mL 玻璃比色皿，依次加入 **5μL 上清液**和 1000μL 试剂二，迅速混匀，于 450nm 处测定 3min 内吸光值变化，第 10s 吸光值记为 A3，第 190s 吸光值记为 A4。**△A 测定管=A4-A3**

注意：空白管只需测定一次。

CarE 活性计算公式：

1 组织中 CarE 活性

（1） 按照蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白在 37℃反应体系中每分钟催化吸光值增加 1 定义为 1 个酶活单位。

CarE 酶活(U/mg prot)= (△A 测定管-△A 空白管) ×V 反总÷(Cpr×V 样)÷T

= 67×(△A 测定管-△A 空白管)÷Cpr

Cpr：蛋白质浓度，mg/mL；V 样：加入上清液体积，0.005 mL；T：反应时间，3min。V 反总：1.005mL；蛋白质浓度需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

（2） 按照样品质量计算

单位的定义：每 g 组织在 37℃反应体系中每分钟催化吸光值增加 1 定义为 1 个酶活单位。

CarE 酶活(U/g 鲜重)= (△A 测定管-△A 空白管) ×V 反总×（V 样总÷V 样）÷W÷T

= 67×(△A 测定管-△A 空白管)÷W

V 样总：上清液总体积，1 mL；V 样：加入上清液体积(mL)，0.005 mL；V 反总：1.005mL；W：样品质量（g）；T：反应时间（min），3min。

2 细菌或细胞中 CarE 活性

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在 37℃反应体系中每分钟催化吸光值增加 1 定义为 1 个酶活单位。

CarE 酶活(U/10^4 cell)= (△A 测定管-△A 空白管) ×V 反总×（V 样总÷V 样）÷细胞密度（10^4 cell/mL）÷T

= 67×(△A 测定管-△A 空白管)÷细胞密度（10^4 cell/mL）

V 总：上清液总体积，1 mL；V 样：加入上清液体积(mL)，0.005 mL；V 反总：1.005mL ；T：反应时间（min），3min。

3. 液体中 CarE 活性

单位的定义：每毫升样品在 37℃反应体系中每分钟催化吸光值增加 1 定义为 1 个酶活单位。

CarE 酶活(U/mL)= (△A 测定管-△A 空白管) ×V 反总÷V 样÷T

= 67×(△A 测定管-△A 空白管)

V 样总：上清液总体积，1 mL；V 样：加入上清液体积(mL)，0.005 mL；V 反总：1.005mL；T：反应时间（min），3min。