

乙酰酯酶(Acetylsterase, AE)活性测定试剂盒

分光法 24 样

产品简介

乙酰酯酶 (EC 3.1.1.6, AE) 已被证明是消除饲料细胞壁中阿魏酸等酚酸类木质素的关键酶。可与其他细胞壁降解酶协同作用共同促进饲料等细胞壁的降解。

试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂×2 支	4°C保存	临用前每支加 0.7mL 无水乙醇混匀溶解, 仍 4°C保存。
试剂三	液体 5mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉体×1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

所需的仪器和用品

分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、可调试移液器、台式离心机、水浴锅、研钵、冰。

乙酰酯酶 (AE) 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°C × 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°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 (10^4): 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 可见分光光度计预热 30 min, 调节波长为 405nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂于 25°C水浴中预热 10 min。

③ 在 EP 管中依次加入下列试剂:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	100	100
试剂一	460	500
试剂二	40	
混匀, 40°C 孵育 30min。		
试剂三	100	100

混匀, 取全部上清液至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中 (若有浑浊可 8000rpm 离心 5min 后取上清), 于 405nm 读取 A 值, $\Delta A = A - A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。

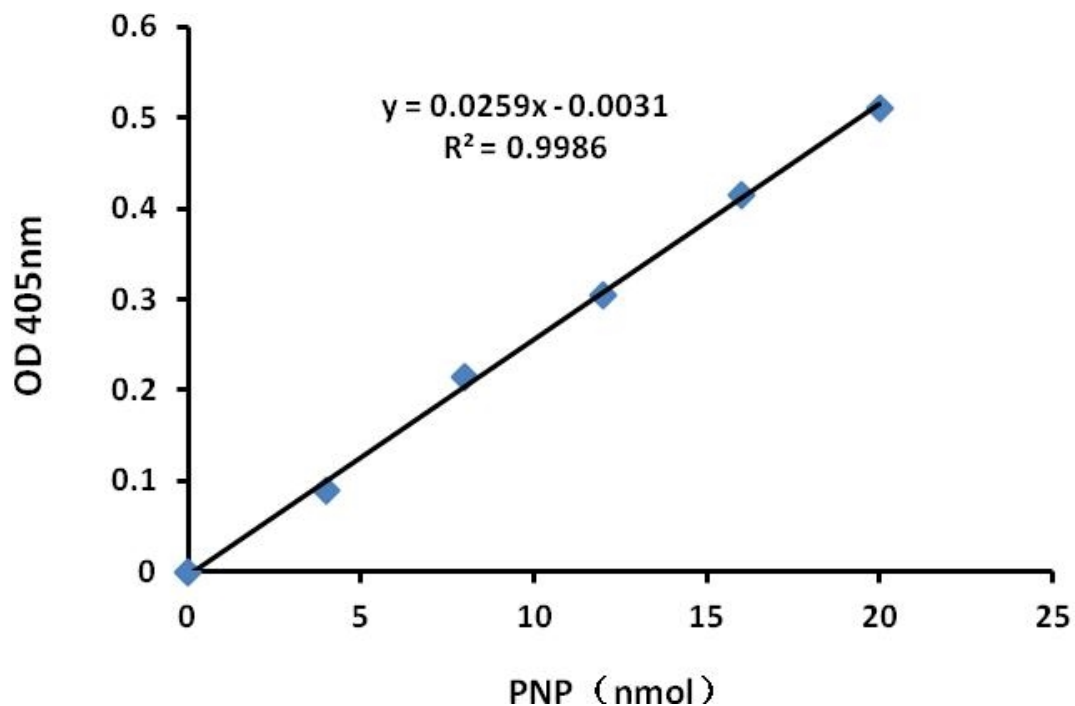
[注]: ① 若 ΔA 的值非常低在零附近, 可增加样本量 V1 (如增至 200 μ L, 则试剂一相应减少) 或延长反应时间 T (如增至 60min 或更长), 则重新调整的 V1 和 T 代入公式重新计算。

② 若 ΔA 的值超过 1, 则需要稀释样本, 稀释倍数 D 代入计算公式。

结果计算

1、标准曲线:

$y = 0.0259x - 0.0031$, x 是 PNP 摩尔质量 (nmol); y 是 ΔA 。



2、按照样本质量计算:

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

$AE \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0031) \div 0.0259] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 12.9 \times (\Delta A + 0.0031) \div W \times D。$

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产生 1nmol PNP 定义为一个酶活单位。

$AE \text{ (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0031) \div 0.0259] \div (Cpr \times V1) \div T \times D = 12.9 \times (\Delta A + 0.0031) \div Cpr \times D。$

4、按细菌/细胞数量计算:

酶活定义: 每 10^4 个细胞每分钟水解底物产生 1nmol PNP 定义为一个酶活单位。

$AE \text{ (nmol/min}/10^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0031) \div 0.0259] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D$
 $= 0.03 \times (\Delta A + 0.0031) \times D。$

5、按液体体积计算:

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

$AE \text{ (nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0031) \div 0.0259] \div V1 \div T = 12.9 \times (\Delta A + 0.0031)$

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。

D---稀释倍数, 未稀释即为 1; 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 ($10 \mu\text{mol/mL}$): 向标准品 EP 管里面加入 1.4ml 蒸馏水超声溶解。
2. 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.2 $\mu\text{mol/ml}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
3. 依据对照管的加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。