

乙酰酯酶(AE)活性检测试剂盒

微板法 48 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 60mL×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 0.6mL 无水乙醇混匀溶解, 仍 4°C保存。
试剂三	液体 6mL×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:

酶标仪、96 孔板、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、蒸馏水。

乙酰酯酶 (A E) 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 酶标仪预热 30 min, 调节波长为 405nm。

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)	样本管	对照管
样本	100	100
试剂一	220	240
试剂二	20	
混匀, 40°C孵育 30min。		
试剂三	60	60
混匀, 取 200 μL 上清液至 96 孔板中 (若有浑浊可 8000rpm 离心 5min 后取上清), 于 405nm 读取 A 值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每		

个样本做一个自身对照)。

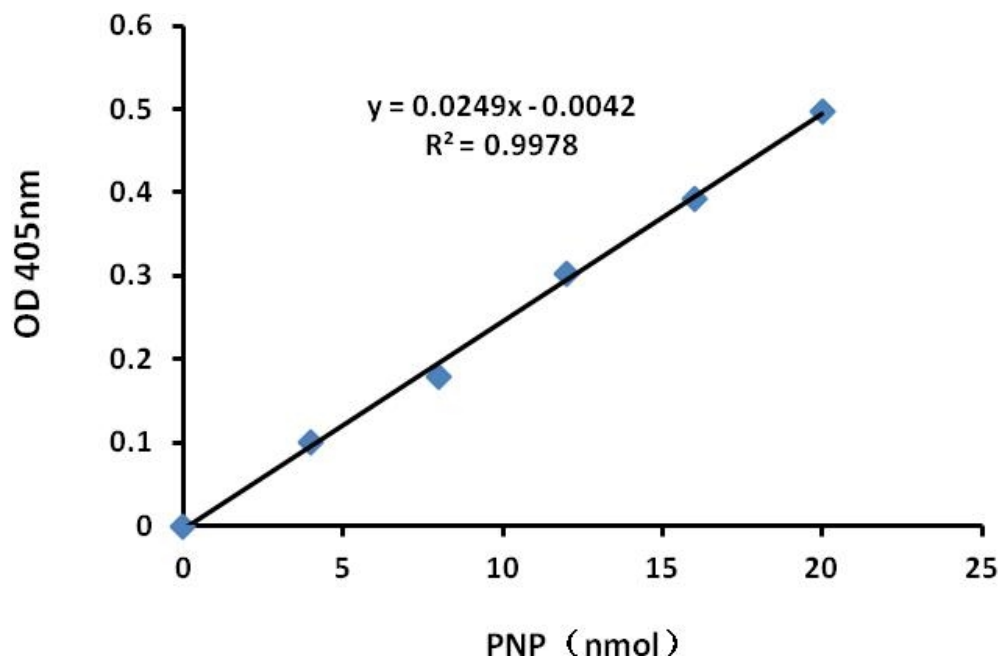
【注】：① 若 ΔA 的值非常低在零附近，可增加样本量 V1 (如增至 150 μ L，则试剂一相应减少) 或延长反应时间 T (如增至 60min 或更长)，则重新调整的 V1 和 T 代入公式重新计算。

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：

$y = 0.0249x - 0.0042$ ，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。

$AE \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0042) \div 0.0249] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 13.4 \times (\Delta A + 0.0042)$

$\div W \times D$

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。

$$AE \text{ (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0042) \div 0.0249] \div (Cpr \times V1) \div T \times D = 13.4 \times (\Delta A + 0.0042) \div Cpr \times D$$

4、按细菌/细胞数量计算：

酶活定义：每 10⁴ 个细胞每分钟水解底物产生 1nmol PNP 定义为一个酶活单位。

$$AE \text{ (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0042) \div 0.0249] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D = 0.03 \times (\Delta A + 0.0042) \times D$$

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。

$$AE \text{ (nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0042) \div 0.0499] \div V1 \div T = 13.4 \times (\Delta A + 0.0042)$$

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 μ 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 μ 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。