



乙酰酯酶（AE）活性检测试剂盒

可见分光光度法

货号: R45005-24S

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。

本试剂盒采用乙酰酯酶 (AE) 分解底物对-硝基苯乙酯生成对-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乙酰酯酶(AE) 活性。

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

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。

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℃×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(10^4):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。

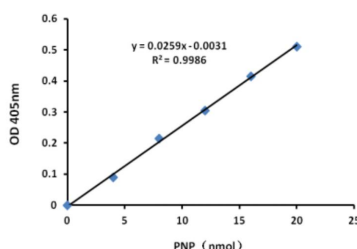
②所有试剂于25℃水浴中预热10 min。

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℃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, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

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。

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

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。

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

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。

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

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。

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

W---样品质量, g;

V---提取液体积, 1mL;

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;

50---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:



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: 3008007435@qq.com

- 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。



源叶