

阿魏酸酯酶（Feruloyl esterase, FAE）活性测定试剂盒说明书

（货号：BP10436W 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

阿魏酸酯酶(FAE, EC 3.1.1.73)又称肉桂酸酯酶或肉桂酸水解酶，是一种胞外羧酸酯酶，阿魏酸酯酶主要降解细胞壁多糖或果胶中阿拉伯糖或半乳糖或羟基肉桂酸之间的酯键。

阿魏酸酯酶(FAE) 催化底物阿魏酸对硝基苯酯分解生成对-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阿魏酸酯酶(FAE) 活性。

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	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 2 支	-20℃避光保存	每支： 1. 临用前 8000g 4℃ 离心 2min 使试剂落入管底； 2. 加入 1.2mL 无水乙醇混匀溶解，静置一分钟后，取上清液测定； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉体 1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

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、指标测定：

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：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 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。

- ③ 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（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30 min（等仪器过自检程序亦可），调节波长为 405nm。
- ② 所有试剂于 25℃水浴中预热 10 min。
- ③ 在 96 孔板中依次加入下列试剂：

试剂组分（μL）	测定管
样本	50

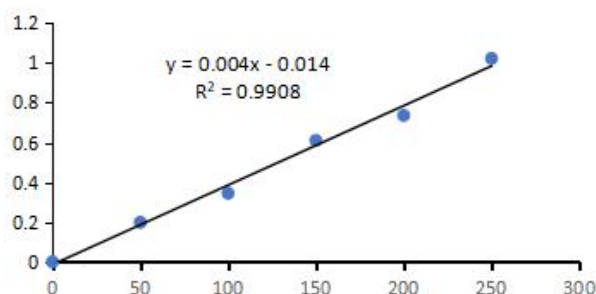
试剂一	130
试剂二	20
混匀，立即于 405nm 处读取吸光值 A1，40℃ 孵育 30min 后读取 A2。 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】：① 若 ΔA 值小于 0.01，可延长反应时间 T（如增至 60min 或更长），或增加样本量 V1（如增至 100 μ L，则试剂一相应减少），则重新调整的 V1 和 T 代入公式重新计算。

② 若 A1 的值超过 1.5，可减少样本量 V1（如减至 30 μ L，则试剂一相应增加），则调整后的 V1 代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.004x - 0.014$ ，x 是标准品（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生成 1nmol 的 PNP 定义为一个酶活单位。

$$\text{FAE (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.014) \div 0.004] \div (W \times V1 \div V) \div T = 166.67 \times (\Delta A + 0.014) \div W$$

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生成 1nmol 的 PNP 定义为一个酶活单位。

$$\text{FAE (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.014) \div 0.004] \div (Cpr \times V1) \div T = 166.67 \times (\Delta A + 0.014) \div Cpr$$

4、按液体体积计算：

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

$$\text{FAE (nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.014) \div 0.004] \div V1 \div T = 166.67 \times (\Delta A + 0.014)$$

5、细菌/细胞数量计算：

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

$$\text{FAE (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.014) \div 0.004] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.33 \times (\Delta A + 0.014)$$

W---样品质量，g；

V---提取液体积，1 mL；

V1---上清液体积（mL），0.05mL；

T---反应时间，30 min。

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 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 制备标准品母液（10 μ mol/mL）：向标准品 EP 管里面加入 1ml 乙醇溶解。

- 3 将母液用乙醇稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 1, 2, 3, 4, 5 $\mu\text{mol/ml}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 500 μL ，加入 500 μL 乙醇，混匀得到 5 $\mu\text{mol/ml}$ 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{mol/ml}$	0	1	2	3	4	5
标品稀释液 μL	0	40	80	120	160	200
乙醇 μL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 5 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。在 96 孔板中依次加入下列试剂：

试剂组分 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	50	
乙醇		50
试剂一	150	150
混匀，立即于 405nm 处读取吸光值 A1，40°C 孵育 30min 后读取 A2。 $\Delta A = \text{标准管 (A1-A2)} - 0 \text{ 浓度管 (A1-A2)}$ 。		