

乙酰酯酶（Acetylsterase, AE）活性测定试剂盒说明书

（货号：BP10437W 微板法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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。

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 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 2 支	-20℃避光保存	1. 临用前每支加 0.6mL 无水乙醇混匀溶解； 2. 仍 4℃ 保存。
试剂三	液体 6mL×1 瓶	4℃ 保存	
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 EP 管中依次加入下列试剂：

试剂组分（μL）	测定管	对照管
样本	100	100
试剂一	220	240
试剂二	20	
混匀，40℃ 孵育 30min。		
试剂三	60	60
混匀，取 200μL 上清液至 96 孔板中（若有浑浊可		

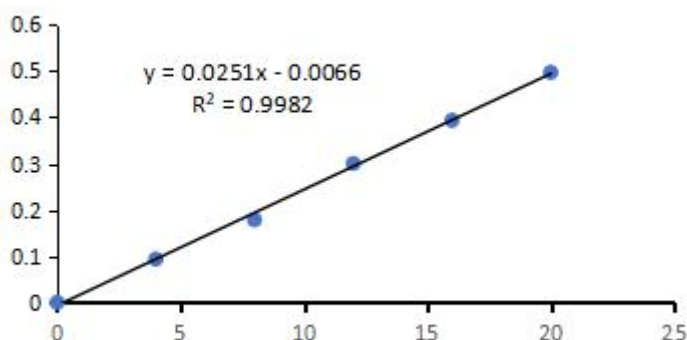
8000rpm 离心 5min 后取上清)，于 405nm 读取 A 值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。

【注】：① 若 ΔA 的值非常低在零附近，可增加样本量 V_1 (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 V_1 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；

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.0251x - 0.0066$ ， 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。

$$AE \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0066) \div 0.0251] \div (W \times V_1 \div V) \div T \times D = 13.28 \times (\Delta A + 0.0066) \div W \times D$$

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。

$$AE \text{ (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0066) \div 0.0251] \div (Cpr \times V_1) \div T \times D = 13.28 \times (\Delta A + 0.0066) \div Cpr \times D$$

4、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。

$$AE \text{ (nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0066) \div 0.0499] \div V_1 \div T = 13.28 \times (\Delta A + 0.0066)$$

5、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。

$$AE \text{ (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0066) \div 0.0251] \div (500 \times V_1 \div V) \div T \times D = 0.027 \times (\Delta A + 0.0066) \times D$$

W---样品质量，g；

V---提取液体积，1 mL；

V_1 ---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 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 1.4ml 蒸馏水超声溶解。
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.2 μ 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 100uL，加入 4.9mL 蒸馏水，混匀得到 0.2 $\mu\text{mol/ml}$ 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{mol/ml}$	0	0.04	0.08	0.12	0.16	0.2
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
蒸馏水 uL	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 EP 管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	100	
蒸馏水		100
试剂一	220	220
试剂二	20	20
混匀，40℃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， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。		