

阿魏酸酯酶(FAE)活性试剂盒

规格：100 管/96 样

检测原理：微量法

编号： ml301018

检测波长： 340nm

注意：

正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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, 能够水解植物细胞壁中阿魏酸与多糖或木质素之间的酯键, 释放游离阿魏酸并促进多糖降解。

NADPH 氧化酶 (NAO) 将 NADPH 氧化为 NADP+的同时生成超氧阴离子($O_2 \cdot^-$), 接着与显色剂反应生成水溶性的黄色物质。对照通过添加该酶的特异性抑制剂 DPI 排除背景值。最终检测生成的有色物质在 450nm 处的吸光值, 即可计算得出 NAO 酶活性大小。

测定原理：

阿魏酸酯酶(FAE)催化底物阿魏酸甲酯分解, 通过检测阿魏酸甲酯于 340nm 的下降速率即可得出阿魏酸酯酶(FAE)酶活力大小。

所需的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、无水乙醇、蒸馏水

试剂盒组分与配制：

提取液：液体 120mLx1 瓶，4°C保存；

试剂一：液体 15mLx1 瓶，4°C保存；

试剂二：粉剂x1 瓶，4°C避光保存，临用前加入 4mL 无水乙醇溶解；

标准品：粉剂 x1 支，若重做标曲，则用到该试剂，4°C避光保存；

样本提取：

1、组织的处理：称取 0.1g 组织样本加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆，4°C，12000rpm 离心 15min，取 上清液待测。

2、细菌或细胞处理：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量 (10^4 个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 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 20%或 200W，超声 3S，间隔 10S，重复 30 次)，4°C，12000rpm 离心 10min，取 上清液待测。

3、液体样本：澄清的液体可直接测定，若浑浊则离心取上清测定。

测定步骤：

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

2、所有试剂于 25°C水浴中预热 10min。

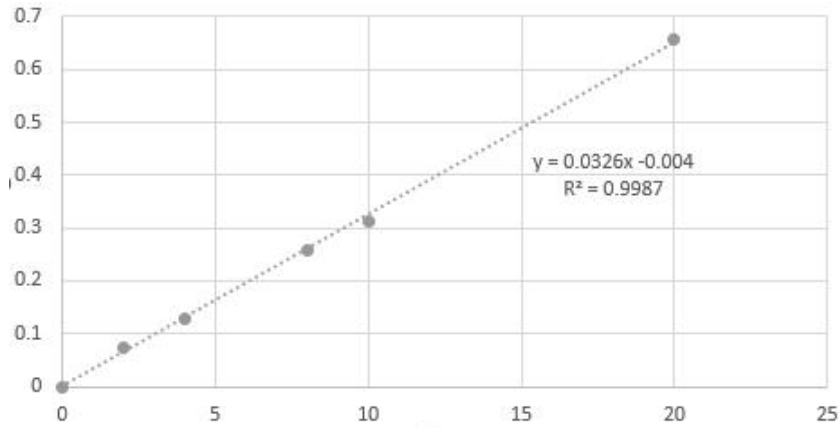
3、加样表 (在 96 孔板中加入下列试剂)：

试剂 (μL)	测定管
样本	50
试剂一	130
试剂二	20

混匀，立即于 340nm 处读取吸光值 A1，40°C孵育 30min 后读取吸光值 A2。 $\Delta A = A1 - A2$

阿魏酸酯酶活性计算：

标准曲线: $y=0.0326x-0.004$, $R^2=0.9987$ 。x 是标准品摩尔质量(nmol), y 是 ΔA 。



标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法咨询技术支持。

1、按样本鲜重计算

酶活定义：每克组织每分钟水解 1nmol 底物阿魏酸甲酯定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{FAE}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.004) \div 0.0326] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 20.45 \times (\Delta A + 0.004) \div W \end{aligned}$$

2、按细菌或细胞密度计算

酶活定义：每 10^4 个细胞每分钟水解 1nmol 底物阿魏酸甲酯定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{FAE}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.004) \div 0.0326] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 0.041 \times (\Delta A + 0.004) \end{aligned}$$

3、按体积计算

酶活定义：每毫升液体每分钟水解 1nmol 底物阿魏酸甲酯定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{FAE}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) &= [(\Delta A + 0.004) \div 0.0326] \div V1 \div T \\ &= 20.45 \times (\Delta A + 0.004) \end{aligned}$$

W: 样本质量, g;

V: 提取液体积, 1mL;

V1: 上清液体积(mL), 0.05mL;

T: 反应时间, 30min;

500: 细胞数量, 万;

预实验的意义:

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测, 以免造成试剂盒和样本的浪费 (比如低表达处理的样本) ;
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程, 尤其是初次使用生化试剂盒测定;
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适;
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题, 以便于及时作出调整;
- 5、通过 3 - 5 组预实验, 判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围, 指导实验样本稀释比例。