

阿魏酸酯酶活性试剂盒

规格：100管/96样

检测原理：微量法

编号：JLC_K14907

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(O₂^{·-}), 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120mL×1瓶, 4℃保存;

试剂一：液体15mL×1瓶, 4℃保存;

试剂二：粉剂×1瓶, 4℃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℃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℃，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（10⁴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℃，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。

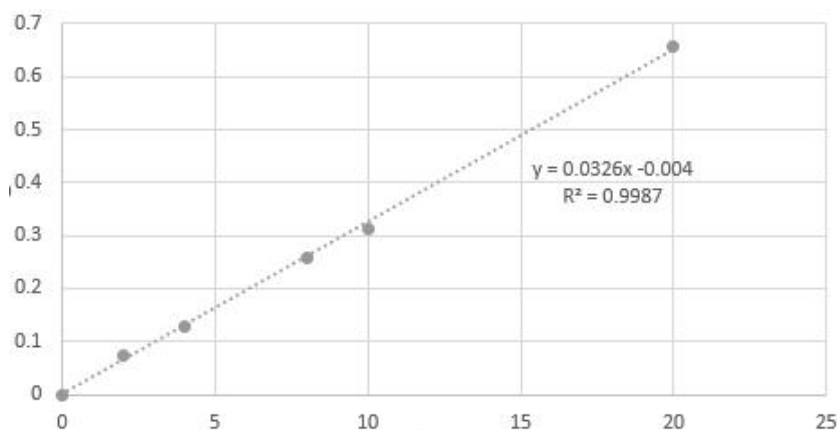
测定步骤

- 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℃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℃孵育30min后读取吸光值A2。ΔA=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10⁴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适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。