

氨基比林-N-脱甲基酶(AND)活性检测试剂盒说明书

(货号: ADS-F-D046 分光法 24 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

细胞色素 P450 酶是一组在外源物质代谢中, 尤其是药物和毒物, 具有重要作用的酶系。AND 作为 P450 酶系的重要一员, 相当于 CYP3A4 亚型, 与药物的去甲基化反应密切相关。

AND 催化氨基比林释放甲醛, 通过 Nash 比色法测定甲醛含量, 即可计算出 AND 活性。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加 60mL 蒸馏水充分溶解。
试剂二	液体 70mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂×1 瓶	4℃避光保存	临用前加入 2.6 mL 无水乙醇, 充分溶解。
试剂四	粉剂×1 瓶	-20℃保存	临用前加入 2.6 mL 蒸馏水, 充分溶解。
试剂五	粉剂×1 瓶	室温保存	临用前加蒸馏水 10mL 充分溶解。
试剂六	液体 10ml×1 瓶	室温保存	
试剂七	液体 25ml×1 瓶	4℃保存	
标准品	液体 1ml×1 瓶	-20℃避光保存	临用前取 1.5 mL EP 管, 加入 10μl 标准液, 加 990μl 蒸馏水, 混匀即为 0.05 mmol/L 标准甲醛溶液, 4℃保存。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、超速离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、无水乙醇、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) 除去细胞核, 线粒体等大分子物质: 称约 0.5g 组织, 加入 1 mL 试剂一, 冰上充分研磨, 10 000g 4℃离心 30min, 取上清液转入超速离心管。

(2) 粗制微粒体: 4℃, 100 000g, 离心 60min, 弃上清液。

(3) 除血红蛋白等杂质: 向步骤 2 的沉淀中加 1mL 试剂一, 盖紧后充分震荡溶解, 100 000g 离心 30min, 弃上清液。

(4) 最终微粒体: 向步骤 3 的沉淀中加试剂二 0.5 mL, 盖紧后充分震荡溶解, 即粗酶液, 待测。该待测液需当天使用。

【注】:若增加样本量, 可按照细菌或细胞数量(10^4 个): 提取液体积(mL)为 500~1000:1 的比例进行提取。

2、检测步骤:

① 打开分光光度计预热 30min (等待仪器过自检程序亦可), 设定波长到 412nm, 蒸馏水调零。

② 试剂二置于 37℃水浴中预热 30min 以上。

③ 按下表在 EP 管中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管	对照管	标准管(仅做一次)
粗酶液	50	50	-

标准品	-	-	500
蒸馏水	-	50	-
试剂二	850	850	-
试剂三	50	50	-
试剂四	50	-	-
混匀后置于 37℃ 水浴保温 30min，立即加入			
试剂五	175	175	-
混匀后置于冰浴中 5min；取出后加入			
试剂六	175	175	-
混匀后室温静置 5min；室温 8000rpm 离心 5min；取新的 EP 管，加入 500μL 上清液			
试剂七	500	500	500
混匀后 60℃ 水浴 10min，然后取出，用冷水冷却 5min，于 412nm 测定光吸收。			

- 【注】：1.若△A 小于 0.01，则可增加样本质量 W 或细胞数量，则改变后的 W 或细胞数量需带入公式重新计算。
2. 粗酶液需在当日完成测定，如需保存则向粗酶液提取步骤 3 的沉淀中加 0.5ml 20%的甘油，分装后，-80℃保存。
3. 试剂三和试剂四需临用前配制，如当天没有用完，4℃避光保存，可用 1 周。
4. 粗酶液可直接用于蛋白浓度测定，建议用 BCA 法测蛋白含量。

五、结果计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：活性单位 (U) 定义：37℃中每分钟每毫克蛋白催化产生 1μmol 甲醛。

$$\text{AND 活性(U/mg prot)} = C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div A \text{ 标准管} \times \text{稀释倍数} \div (C_{pr} \times V \text{ 样}) \div T$$

$$= 0.045 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div A \text{ 标准管} \div C_{pr}$$

(2) 按样本鲜重计算

活性单位 (U) 定义：37℃中每分钟每克组织催化产生 1μmol 甲醛。

$$\text{AND 活性(U/g 鲜重)} = C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div A \text{ 标准管} \times \text{稀释倍数} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T$$

$$= 0.0225 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div A \text{ 标准管} \div W$$

W---取样质量，g；

C 标准品：0.05 mmol/L=50μmol/L；

稀释倍数：V 反总÷V 上清液= (50+850+50+50+175+175) ÷500=2.7；

V 样：加入粗酶液体积，50μL=0.05mL；

V 样总：提取液体积，0.5 mL；

V 标准品：500μL=0.0005 L；

T：催化反应时间 (min)，30min；

Cpr---上清液蛋白浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。