氨基比林-N-脱甲基酶(AND)活性检测试剂盒说明书

（货号：ADS-W-D046　微板法　48 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 100mL 蒸馏水充分溶解。
试剂二	液体 50ml×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂×1 瓶	4℃避光保存	临用前加入 1mL 无水乙醇，充分溶解。
试剂四	粉剂×1 瓶	-20℃保存	临用前加入 0.5mL 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 4mL 充分溶解。
试剂六	液体 5ml×1 瓶	室温保存	
试剂七	液体 10ml×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）、96 孔板、离心管、酶标仪、**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	10	10	-

标准品	-	-	100
蒸馏水	-	10	-
试剂二	170	170	-
试剂三	10	10	-
试剂四	10	-	-
混匀后置于 37℃水浴保温 30min，立即加入			
试剂五	35	35	-
混匀后置于冰浴中 5min；取出后加入			
试剂六	35	35	-
混匀后室温静置 5min；室温 8000rpm 离心 5min；取新的 EP 管，加入 100μL 上清液			
试剂七	100	100	100
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。

AND 活性(U/mg prot) = C 标准品×V 标准品×（A 测定管－A 空白管）÷A 标准管×稀释倍数÷（Cpr×V 样）÷T

=0.045×（A 测定管－A 空白管）÷A 标准管÷Cpr

（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。

AND 活性(U/g 鲜重) = C 标准品×V 标准品×（A 测定管－A 空白管）÷A 标准管×稀释倍数÷(V 样÷V 样总×W)÷T

=0.0225×（A 测定管－A 空白管）÷A 标准管÷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。