

苯胺-4-羟化酶(AH)活性检测试剂盒说明书

(货号: ADS-W-D047 微板法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

细胞色素 P450 酶是一组主要存在于肝脏的同工酶, 在外源物质代谢中具有重要作用, 尤其是药物和毒物的代谢。AH 在 P450 酶系中相当于 CYP2E1 亚型, CYP2E1 不仅参与了药物的代谢, 而且还能催化多种前致癌物和前毒物的活化过程。

AH 催化苯胺羟化后产生的 4-氨基酚, 进一步转变为酚-吲哚复合物, 在 630nm 处有特征吸收峰; 通过测定 630nm 吸光度增加速率, 来计算 AH 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 30m×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂×1 瓶	-20℃保存	临用前加入 10 mL 蒸馏水, 充分溶解。
试剂四	粉剂×1 瓶	4℃避光保存	临用前加入 5mL 蒸馏水, 充分溶解。
试剂五	液体 10ml×1 瓶	4℃保存	
试剂六	粉剂×1 瓶 (腐蚀性试剂)	4℃避光保存	临用前加入 10mL 蒸馏水, 充分溶解。
试剂七	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入 10 mL 蒸馏水, 充分溶解。
标准品	液体 1ml×1 瓶	4℃避光保存	标品浓度: 10μmol/L。

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、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 630nm, 蒸馏水调零。

② 试剂三置于 37℃ 水浴中预热 30min 以上, 试剂五置于冰浴预冷 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	-	-	100
蒸馏水	-	50	-
试剂三	100	100	-
试剂四	50	-	-
混匀后置于 37℃ 水浴保温 30min，立即加入			
试剂五	100	100	-
混匀后冰浴 5min，11000rpm，4℃，离心 10min；取 100μL 上清液，加入 1 支新的 1.5 mL EP 管；			
试剂六	100	100	100
试剂七	100	100	100
混匀后室温静置 30min，吸取 200uL 至 96 孔板中，于 630 nm 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。

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℃ 中每毫克蛋白每分钟催化产生 1μmol 4-氨基酚。

AH 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

= 0.002× (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℃ 中每克组织每分钟催化产生 1μmol 4-氨基酚。

AH 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

= 0.001× (A 测定管 - A 空白管) ÷ A 标准管÷W

W---取样质量，g；

C 标准品：10μmol/L；

稀释倍数： V 反总÷V 上清液=1500μL÷500μL=3；

V 样：加入反应体系中粗酶液体积， 50μL=0.05 mL； V 样总：提取液体积， 0.5mL；

V 标准品：100μL=1×10⁻⁴L；

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。