

氨基比林-N-去甲基化酶（AND）活性检测试剂盒（微量法）

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

产品货号：BA1046

产品规格：100管/48样

产品简介：

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。

产品组成：

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×1瓶，4℃保存。

试剂三：粉剂×1管，4℃避光保存。临用前加入1mL无水乙醇，充分溶解。

试剂四：粉×1管，4℃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×1瓶，室温保存。

试剂七：液×1瓶，4℃保存。

标准液：液体×1瓶，-20℃保存。临用前取1.5mL EP管，加入10μl标准液，加990μl蒸馏水，混匀即为0.05mmol/L标准甲醛溶液，4℃保存。

需自备的仪器和用品：

普通离心机，超速离心机、水浴锅、可调式移液枪、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板、蒸馏水、无水乙醇和冰。

操作步骤：

一、粗酶液提取：

1. 除去细胞核，线粒体等大分子物质：称约0.5g组织，加入1mL试剂一，冰上充分研磨，10000g 4℃离心30min，取上清液转入超速离心管。
2. 粗制微粒体：4℃，100000g，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，100000g离心30min，弃上清液。
4. 最终微粒体：向步骤3的沉淀中加试剂二0.5mL，盖紧后充分震荡溶解，即粗酶液，待测。该待测液需当天使用。

二、AND 活性测定步骤：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长到 412nm，蒸馏水调零。
2. 试剂二置于 37℃水浴中预热 30min。
3. 对照管：取 1 支 EP 管，加入 10μL 粗酶液，170μL 试剂二，10μL 试剂三，10μL 蒸馏水，混匀后置于 37℃水浴保温 30min；立即加入 35μL 试剂五，混匀后置于冰浴中 5min；取出后加入 35μL 试剂六，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，100μL 试剂七，混匀后 60℃水浴 10min，然后取出，用冷水冷却 5min，于 412nm 测定光吸收，记为 A 对照管。
4. 测定管：取 1 支 EP 管，加入 10μL 粗酶液，170μL 试剂二，10μL 试剂三，10μL 试剂四，混匀后置于 37℃水浴保温 30min；立即加入 35μL 试剂五，混匀后置于冰浴中 5min；取出后加入 35μL 试剂六，混匀后室温静置 5min；室温 8000rpm 离心 5min；取 1 支新 EP 管，加入 100μL 上清液，100μL 试剂七，混匀后 60℃水浴 10min，然后取出，用冷水冷却 5min，于 412nm 测定光吸收，记为 A 测定管。
5. 标准管：取 1 支 EP 管，加入 100μL 标准品，100μL 试剂七，混匀后 60℃水浴 10min，然后取出，用冷水冷



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

却 5min, 于 412nm 测定光吸收, 记为 A 标准管。

注意: 每个样品都需要做对照管。

三、AND 活性计算:

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义: 37°C中每分钟每毫克蛋白催化产生 1nmol 甲醛为 1 个酶活单位。

$$\text{AND 活性(nmol/min/mg prot)} = \frac{C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})}{A \text{ 标准管} \times \text{稀释倍数}} \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T \\ = 45 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \div Cpr。$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义: 37°C中每分钟每克组织催化产生 1nmol 甲醛为 1 个酶活单位。

$$\text{AND 活性(nmol/min/g 鲜重)} = \frac{C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})}{A \text{ 标准管} \times \text{稀释倍数}} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T \\ = 22.5 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \div W。$$

C 标准品: 0.05 mmol/L=50 μ mol/L;

V 标准品: 100 μ L=0.0001 L;

稀释倍数: V 反总 \div V 上清液=(10+170+10+10+35+35) \div 100=2.7;

Cpr: 粗酶液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定, 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒;

V 样: 加入粗酶液体积, 10 μ L=0.01mL;

V 样总: 提取液体积, 0.5mL;

W: 样本质量, g ;

T: 催化反应时间 (min), 30min。

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义: 37°C中每分钟每毫克蛋白催化产生 1nmol 甲醛为 1 个酶活单位。

$$\text{AND 活性(nmol/min/mg prot)} = \frac{C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})}{A \text{ 标准管} \times \text{稀释倍数}} \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T \\ = 45 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \div Cpr。$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义: 37°C中每分钟每克组织催化产生 1nmol 甲醛为 1 个酶活单位。

$$\text{AND 活性(nmol/min/g 鲜重)} = \frac{C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})}{A \text{ 标准管} \times \text{稀释倍数}} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T \\ = 22.5 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \div W。$$

C 标准品: 0.05 mmol/L=50 μ mol/L;

V 标准品: 100 μ L=0.0001 L;

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

Cpr: 粗酶液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定, 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒;

V 样: 加入粗酶液体积, 10 μ L=0.01mL;

V 样总: 提取液体积, 0.5mL;

W: 样本质量, g ;

T: 催化反应时间 (min), 30min。

注意事项:

1. 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°C 保存;
2. 试剂三和试剂四需临用前配制, 如当天没有用完, 4°C避光保存, 可用 1 周;
3. 粗酶液可直接用于蛋白浓度测定, 建议用 BCA 法测蛋白含量。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com