

碳酸酐酶活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA2202

产品规格：100T/96S

产品简介：

碳酸酐酶(Carbonic Anhydrase,CA,EC4.2.1.1)是一种以 Zn^{2+} 为活性中心的金属酶，可用来高效催化 CO_2 的可逆水合反应： $CO_2+H_2O \leftrightarrow HCO_3^-+H^+$ ，催化速率可达自然条件下的 10^7 倍，是目前已知催化速率最快的酶之一。

碳酸酐酶可催化乙酸对硝基苯酯反应生成对硝基苯酚,通过检测405nm 处吸光值上升速率反映碳酸酐酶活性。



注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体120mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体20mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×2支	2-8℃
标准品	液体1mL×1支	2-8℃

溶液的配制：

1. 试剂二：试剂放于试剂瓶内玻璃瓶中。临用前取一支试剂二，加入30mL丙酮充分震荡溶解，-20℃可以分装保存1周，避免反复冻融。
2. 试剂二工作液：临用前按试剂二：蒸馏水=20μL:480μL(12T)的比例进行混合配制试剂二工作液，现用现配，用多少配多少。
3. 标准品：5μmol/mL酚标准液。临用前取100μL的5μmol/mL 酚标准液于EP管中，加入700μL蒸馏水充分混合，配制成0.625μmol/mL的酚标准液。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅/恒温培养箱、分析天平、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、蒸馏水和冰。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织：按照组织质量(g)：提取液体积(mL)为 1:5~10 的比例(建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液)，进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
2. 细菌或培养细胞：先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(10^4 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 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次)，8000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
3. 液体：直接测定。(若溶液呈现浑浊，则离心取上清后再测定)。

二、测定步骤

1. 可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 405nm，可见分光光度计用蒸馏水调零。
2. 标准管测定



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

- (1) 标准管的测定：在微量玻璃比色皿/96 孔板加入 20 μ L 标准液，180 μ L 试剂一，充分混匀后于 405nm 处测定吸光值，记作 $A_{\text{标准}}$ 。
- (2) 标准空白管的测定：在微量玻璃比色皿/96 孔板加入 20 μ L 蒸馏水，180 μ L 试剂一，充分混匀后于 405nm 处测定吸光值，记作 $A_{\text{标准空白}}$ 。
- (3) 计算 $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{标准空白}}$ 。(标准管和标准空白管只需做 1-2 次。)
3. 操作表：(在微量玻璃比色皿或者 96 孔板内依次加入下列试剂)

试剂名称 (μ L)	测定管	空白管
样本	20	-
提取液	-	20
试剂一	140	140
试剂二工作液	40	40

按照加样表依次在微量玻璃比色皿/96 孔板加入上述试剂，充分混匀后于 405nm 处测定 10s 时的吸光值 A_1 ，迅速置于 37 $^{\circ}$ C 水浴或恒温培养箱 5min(酶标仪有控温功能可将温度调至 37 $^{\circ}$ C)，拿出迅速擦干测定 5min10s 时的吸光值 A_2 。计算 $A_{\text{测定}} = A_2 - A_1$ ， $A_{\text{空白}} = A_2 - A_1$ ， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。(空白管只需做 1-2 次。)

三、CA 活性计算

- (1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：37 $^{\circ}$ C，每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1 μ mol 对硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{CA 活性(U/mg prot)} = C_{\text{标}} \times \Delta A \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times F = 0.125 \times \Delta A \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times F$$

- (2) 按样本质量计算

单位的定义：37 $^{\circ}$ C，每 g 组织每分钟催化产生 1 μ mol 对硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{CA 活性(U/g 质量)} = C_{\text{标}} \times \Delta A \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \times F = 0.125 \times \Delta A \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F$$

- (3) 按液体体积计算

单位的定义：每 mL 液体每分钟催化产生 1 μ mol 对硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{CA 活性(U/mL)} = C_{\text{标}} \times \Delta A \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T \times F = 0.125 \times \Delta A \div \Delta A_{\text{标准}} \times F$$

- (4) 按细菌/细胞数量计算

单位的定义：37 $^{\circ}$ C，每万个细菌/细胞每分钟催化产生 1 μ mol 对硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{CA 活性(U/10}^4 \text{ cell)} = C_{\text{标}} \times \Delta A \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times N) \div T \times F = 0.125 \times \Delta A \div \Delta A_{\text{标准}} \div N \times F$$

$C_{\text{标}}$ ：标准品浓度，0.625 μ mol/mL； $V_{\text{样}}$ ：反应体系中加入的样本体积，0.02mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入的提取液体积，1mL； T ：反应时间，5min； C_{pr} ：蛋白质浓度，mg/mL； W ：样本质量，g； N ：细菌/细胞数量，以万计； F ：样本稀释倍数。

注意事项：

如果 A_1 测定大于 0.5 或者 ΔA 大于 1，可以用蒸馏水对样本进行稀释或者缩短 37 $^{\circ}$ C 酶促反应时间； ΔA 小于 0.02，可以加大样本量或者延长 37 $^{\circ}$ C 酶促反应时间。注意计算时同步修改计算公式。



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