

使用说明书

Instruction Manual

苯胺-4-羟化酶活性检测试剂盒（微量法）

AH Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

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。苯胺-4-羟化酶（Aniline-4-hydroxylase, 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。

检测原理

AH 催化苯胺羟化后产生的 4-氨基酚，进一步转变为酚-吡啶复合物，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。

产品组成及储存条件

100T/48S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0016M-A	粉剂×1 瓶	4℃保存；临用前加 100mL 蒸馏水充分溶解。
CB0016M-B	液体×1 瓶	4℃保存。
CB0016M-C	粉剂×1 瓶	4℃保存；临用前加入 10mL 蒸馏水，充分溶解。
CB0016M-D	粉剂×1 瓶	4℃保存；临用前加入 5mL 蒸馏水，充分溶解。
CB0016M-E	液体×1 瓶	4℃保存。
CB0016M-F	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。
CB0016M-G	粉剂×1 瓶	4℃保存；临用前加入 10mL 蒸馏水充分溶解。
CB0016M-S	液体×1 瓶	标准液 10μmol/L，4℃避光保存。

注：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、自备用品：

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、普通离心机、超速离心机、双蒸水和冰。

二、粗酶液提取：

- 除去细胞核和线粒体等大分子物质：称约 0.5g 组织，加入 1 mL 4℃预冷的 CB0016M-A，冰上充分研磨，10 000g 4℃离心 30min，取上清液转入超速离心管。
- 粗制微粒体：4℃，100 000g，离心 60min，弃上清液。
- 除血红蛋白等杂质：向步骤 2 的沉淀中加 1 mL CB0016M-A，盖紧后充分震荡溶解，100 000g 离心 30min，弃上清液。
- 最终微粒体：向步骤 3 的沉淀中加 CB0016M-B 0.5 mL，盖紧后充分震荡溶解，4℃保存待测。
- 该待测液需当天使用。

三、测定步骤：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min，调节波长到 630 nm，蒸馏水调零。
2. CB0016M-C 在 37°C 水浴中预热 30min。
3. CB0016M-E 置于冰浴预冷 30min。
4. 取 0.5 mL EP 依次加入下列试剂：

	对照管 (μL)	测定管 (μL)	标准管 (μL)
粗酶液	50	50	
CB0016M-C	100	100	
蒸馏水	50	50	
混匀后 37°C 水浴中保温 30min。			
CB0016M-E	100	100	
混匀后冰浴 5min，11000rpm，4°C，离心 10min；取上清液加入新的 1.5 mL EP 管。			
上清液	100	100	
标准品			100
CB0016M-F	100	100	100
CB0016M-G	100	100	100
混匀后室温静置 30min，吸取 200μL 于微量玻璃比色皿/96 孔板，630 nm 测定光吸收，分别标记为 A 对照管、A 测定管、A 标准管。			

注：每个样品都需要做对照管。

四、AH 活性计算公式：

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 中每毫克蛋白每分钟催化产生 1nmol 4-氨基酚为 1 个酶活单位。

AH 活性 (nmol/min/mg prot)

$$= C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \times \text{稀释倍数} \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T$$

$$= 2 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \div Cpr。$$

2. 按样本鲜重计算

活性单位定义：37°C 中每克样本每分钟催化产生 1nmol 4-氨基酚为 1 个酶活单位。

AH 活性 (nmol/min/g 鲜重)

$$= C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \times \text{稀释倍数} \div (W \times V \text{ 样}) \div T$$

$$= 2 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \div W$$

注：C 标准品：10μmol/L；V 标准品：100μL=1×10⁻⁴L；稀释倍数：V 反总÷V 上清液=300μL÷100μL=3；Cpr：粗酶液蛋白质浓度 (mg/mL)，需要另外测定，建议使用 TargetMol 公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒 (C0050)；W：样品质量；V 样：加入反应体系中粗酶液体积，50μL=0.05 mL；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 中每毫克蛋白每分钟催化产生 1nmol 4-氨基酚为 1 个酶活单位。

AH 活性 (nmol/min/mg prot)

$$= C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \times \text{稀释倍数} \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T$$

$$= 2 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \div Cpr$$

2. 按样本质量计算

活性单位定义：37°C 中每克样本每分钟催化产生 1nmol 4-氨基酚为 1 个酶活单位。

AH 活性 (nmol/min/g 鲜重)

= C 标准品×V 标准品×(A 测定管-A 对照管)÷A 标准管×稀释倍数÷(W×V 样)÷T

= 2×(A 测定管-A 对照管)÷A 标准管÷W

注：C 标准品：10μmol/L；V 标准品：100μL=1×10⁻⁴L；稀释倍数：V 反总÷V 上清液=300μL÷100μL=3；Cpr：粗酶液蛋白质浓度 (mg/mL)，需要另外测定，建议使用 TargetMol 公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒 (C0050)；

W：样品质量；V 样：加入反应体系中粗酶液体积，50μL=0.05 mL；T：催化反应时间 (min)，30min。

注意事项

1. 蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
2. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

