

使用说明书

Instruction Manual

苯胺-4-羟化酶活性检测试剂盒（分光光度法）

苯胺-4-羟化酶活性检测试剂盒（分光光度法）

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

50T/24S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0016S-A	粉剂×1 瓶	4℃保存；临用前加 50mL 蒸馏水充分溶解。
CB0016S-B	液体×1 瓶	4℃保存。
CB0016S-C	粉剂×1 瓶	4℃保存；临用前加入 26mL 蒸馏水，充分溶解。
CB0016S-D	粉剂×1 瓶	4℃保存；临用前加入 13mL 蒸馏水，充分溶解。
CB0016S-E	液体×1 瓶	4℃保存。
CB0016S-F	粉剂×1 瓶	（腐蚀性试剂），4℃避光保存；临用前加入 26mL 蒸馏水，充分溶解。
CB0016S-G	粉剂×1 瓶	4℃保存；临用前加入 26mL 蒸馏水充分溶解。
CB0016S-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、1mL 玻璃比色皿、普通离心机、超速离心机、可调式移液枪、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 CB0016S-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 CB0016S-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 CB0016S-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. 分光光度计预热 30 min，调节波长到 630 nm，蒸馏水调零。
2. CB0016S-C 在 37°C 水浴中预热 30min。
3. CB0016S-E 置于冰浴预冷 30min。
4. 取 1.5 mL EP 管依次加入下列试剂：

	对照管 (μL)	测定管 (μL)	标准管 (μL)
粗酶液	250	250	
CB0016S-C	500	500	
蒸馏水	250	250	
混匀后 37°C 水浴中保温 30min；再加入。			
CB0016S-E	500	500	
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	500	500	
标准品			500
CB0016S-F	500	500	500
CB0016S-G	500	500	500
混匀后室温静置 30min，于 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：

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

= 2 × (A 测定管 - A 对照管) ÷ A 标准管 ÷ 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 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：500μL=0.0005L；稀释倍数：V 反总 ÷ V 上清液=1500μL ÷ 500μL=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)；V 样：加入反应体系中粗酶液体积，250μL=0.25 mL；W：样本质量，g；T：反应时间，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。

