

# 使用说明书

## Instruction Manual

## 氨基比林-N-去甲基酶活性检测试剂盒（微量法）

### AND Assay Kit (Microanalysis)

#### 产品描述

细胞色素 P450 酶是一组在外源物质代谢中，尤其是药物和毒物代谢中，具有重要作用的酶系。氨基比林-N-脱甲基酶（Aminopyrine-n-demethylase, 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。

#### 检测原理

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。

#### 产品组成及储存条件

100T/48S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0025M-A	粉剂×1 瓶	4°C保存；临用前加 100mL 蒸馏水充分溶解。
CB0025M-B	液体×1 瓶	4°C保存。
CB0025M-C	粉剂×1 瓶（棕色瓶）	4°C避光保存；临用前加入 1mL 无水乙醇，充分溶解。
CB0025M-D	粉剂×1 瓶	4°C保存；临用前加入 0.5mL 蒸馏水，充分溶解。
CB0025M-E	粉剂×1 瓶	室温保存；临用前加蒸馏水 4mL 充分溶解。
CB0025M-F	液体×1 瓶	室温保存。
CB0025M-G	液体×1 瓶	4°C保存。
CB0025M-S	液体×1 瓶	-20°C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°C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、微量石英比色皿/96 孔板、普通离心机，超速离心机、水浴锅、可调式移液枪、蒸馏水、无水乙醇和冰。

##### 二、粗酶液提取：

- 除去细胞核和线粒体等：称约 0.5g 组织，加入 1 mL 4°C 预冷的 CB0025M-A，冰上充分研磨，10 000g 4°C 离心 30min，取上清液转入超速离心管。
- 粗制微粒体：4°C，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 CB0025M-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 CB0025M-B 0.5 mL，盖紧后充分震荡溶解，4°C 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 412 nm，蒸馏水调零。
2. CB0025M-B 在 37°C 水浴中预热 30min。
3. 取 EP 管依次加入下列试剂：

	对照管 (μL)	测定管 (μL)	标准管 (μL)
提取液	10	10	
CB0025M-B	170	170	
CB0025M-C	10	10	
蒸馏水	10		
CB0025M-D		10	
混匀后置于 37°C 水浴保温 30min；立即加入。			
CB0025M-E	35	35	
混匀后置于冰浴中 5min；取出后加入。			
CB0025M-F	35	35	
混匀后室温静置 5min；室温 8000rpm 离心 5min；取新的 EP 管，加入。			
上清液	100	100	
标准品			100
CB0025M-G	100	100	100
混匀后 60°C 水浴 10min，取出用冷水冷却 5min，于 412nm 测定光吸收，分别记为 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、AND 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 中每分钟每毫克蛋白催化产生 1nmol 甲醛为 1 个酶活单位。

AND 活性 (nmol/min/mg prot)

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

$$= 45 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div A \text{ 标准管} \div Cpr$$

##### 2. 按样本鲜重计算

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

AND 活性 (nmol/min/g 鲜重)

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

$$= 45 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \div W$$

注：C 标准品：0.05 mmol/L=50μmol/L；V 标准品：500μL=0.0005 L；稀释倍数：V 反总÷V 上清液=(50+850+50+50+175+175)÷500=2.7；Cpr：粗酶液蛋白质浓度 (mg/mL)，需要另外测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒 (C0050)；V 样：加入粗酶液体积，50μL=0.05mL；V 样总：提取液体积，0.5mL；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。

AND 活性 (nmol/min/mg prot)

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

$$= 45 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \div Cpr$$

##### 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。

AND 活性 (nmol/min/g 鲜重)

$$= C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \times \text{稀释倍数} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T$$
$$= 45 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \div W。$$

**注：**C 标准品：0.05 mmol/L=50 $\mu$ mol/L；V 标准品：500 $\mu$ L=0.0005 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 TargetMol 生产的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒 (C0050)；V 样：加入粗酶液体积，50 $\mu$ L=0.05mL；V 样总：提取液体积，0.5 mL；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 $^{\circ}$ C保存。
2. CB0025M-C 和 CB0025M-D 需临用前配制，如当天没有用完，4 $^{\circ}$ C避光保存，可用 1 周。
3. 粗酶液可直接用于蛋白浓度测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
4. 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。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

