

使用说明书

Instruction Manual

氨基比林-N-去甲基酶活性检测试剂盒（可见分光光度法） AND Assay Kit (Visible Spectrophotometry)

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

50T/24S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0025V-A	粉剂×1 瓶	4℃保存；临用前加 50mL 蒸馏水充分溶解。
CB0025V-B	液体×1 瓶	4℃保存。
CB0025V-C	粉剂×1 瓶（棕色瓶）	4℃避光保存；临用前加入 2.6mL 无水乙醇，充分溶解。
CB0025V-D	粉剂×1 瓶	4℃保存；临用前加入 2.6mL 蒸馏水，充分溶解。
CB0025V-E	粉剂×1 瓶	室温保存；临用前加蒸馏水 10mL 充分溶解。
CB0025V-F	液体×1 瓶	室温保存。
CB0025V-G	液体×1 瓶	4℃保存。
CB0025V-S	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。

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、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℃预冷的 CB0025V-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 CB0025V-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 CB0025V-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：

- 分光光度计预热 30 min，调节波长到 412 nm，蒸馏水调零。

2. CB0025V-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	50	50	
CB0025V-B	850	850	
CB0025V-C	50	50	
蒸馏水	50		
CB0025V-D		50	
混匀后置于 37°C 水浴保温 30min；立即加入。			
CB0025V-E	175	175	
混匀后置于冰浴中 5min；取出后加入。			
CB0025V-F	175	175	
混匀后室温静置 5min；室温 8000rpm 离心 5min；取新的 EP 管，加入。			
上清液	500	500	
标准品			500
CB0025V-G	500	500	500
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：

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 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

= 45 × (A 测定管 - A 空白管) ÷ A 标准管 ÷ 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 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

= 45 × (A 测定管 - A 对照管) ÷ A 标准管 ÷ W

注：C 标准品：0.05 mmol/L = 50 μmol/L；V 标准品：500 μL = 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，50 μL = 0.05 mL；W：样本质量，g；T：反应时间，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. CB0025V-C 和 CB0025V-D 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。

