

氨基比林-N-去甲基化酶 (AND) 活性检测试剂盒

(分光光度计法)

(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0471	氨基比林-N-去甲基化酶 (AND) 活性检测试剂盒	50 管/24 样

产品内容

名称	规格	储存条件
试剂一	粉剂 ×1 瓶: 临用前加入 50mL 蒸馏水充分溶解。	4℃
试剂二	液体 ×1 瓶: 临用前置于 37℃ 水浴中预热 30min。	4℃
试剂三	粉剂 ×1 管: 临用前加入 2.6mL 无水乙醇充分溶解。	4℃, 避光
试剂四	粉剂 ×1 管: 临用前加入 2.6mL 蒸馏水充分溶解。	4℃
试剂五	粉剂 ×1 瓶: 临用前加入 10mL 蒸馏水充分溶解。	室温
试剂六	液体 ×1 瓶	室温
试剂七	液体 ×1 瓶	4℃
标准液	液体 ×1 瓶: 临用前取 1.5mL EP 管, 加入 10μL 标准液, 加 990μL 蒸馏水, 混匀即为 0.05 mmol/L 标准甲醛溶液, 4℃ 保存。	-20℃

一、产品说明

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, 具有重要作用的酶系。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。

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。

二、自备材料

可见分光光度计、普通离心机、超速离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、无水乙醇、冰和蒸馏水。

三、粗酶液的提取

- 1、除去细胞核, 线粒体等大分子物质: 称约 0.5g 组织, 加入 1 mL 试剂一, 冰上充分研磨, 10000g 4℃ 离心 30min, 取上清液转入超速离心管。
- 2、粗制微粒体: 4℃, 100 000g, 离心 60min, 弃上清液。
- 3、除血红蛋白等杂质: 向步骤 2 的沉淀中加 1mL 试剂一, 盖紧后充分震荡溶解, 100 000g 离心 30min, 弃上清液。
- 4、最终微粒体: 向步骤 3 的沉淀中加试剂二 0.5 mL, 盖紧后充分震荡溶解, 即粗酶液, 待测。该待测液需当天使用。

四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 412nm, 蒸馏水调零。

2、对照管：取 1 支 EP 管，加入 50μL 粗酶液，850μL 试剂二，50μL 试剂三，50μL 蒸馏水，混匀后置于 37℃ 水浴保温 30min；立即加入 175μL 试剂五，混匀后置于冰浴中 5min；取出后加入 175μL 试剂六，混匀后室温静置 5min；室温 8000rpm 离心 5min；取新的 EP 管，加入 500μL 上清液，500μL 试剂七，混匀后 60℃ 水浴 10min，然后取出，用冷水冷却 5min，于 412nm 测定光吸收，记为 A 对照管。

3、测定管：取 1 支 EP 管，加入 50μL 粗酶液，850μL 试剂二，50μL 试剂三，50μL 试剂四，混匀后置于 37℃ 水浴保温 30min；立即加入 175μL 试剂五，混匀后置于冰浴中 5min；取出后加入 175μL 试剂六，混匀后室温静置 5min；室温 8000rpm 离心 5min；取 1 支新 EP 管，加入 500μL 上清液，500μL 试剂七，混匀后 60℃ 水浴 10min，然后取出，用冷水冷却 5min，于 412nm 测定光吸收，记为 A 测定管。

4、标准管：取 1 支 EP 管，加入 500μL 标准品，500μL 试剂七，混匀后 60℃ 水浴 10min，然后取出，用冷水冷却 5min，于 412nm 测定光吸收，记为 A 标准管。

注：每个样品都需要对照管。

五、活性的计算

1、按照样本蛋白浓度计算：

单位的定义：37℃ 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 对照管)÷A 标准管÷Cpr。

2、按照样本鲜重计算：

单位的定义：37℃ 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/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÷(V 样÷V 样总 × W)÷T=45×(A 测定管-A 对照管)÷A 标准管÷W。

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，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒；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。

六、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℃ 保存。

2、试剂三和试剂四需临用前配制，如当天没有用完，4℃ 避光保存，可用 1 周。

3、粗酶液可直接用于蛋白浓度测定，建议用 BCA 法测蛋白含量。