

苯胺-4-羟化酶（AH）活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC2745

规格：100T/48S

产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	粉剂×2 瓶	4℃保存
试剂二	液体 30mL×1 瓶	4℃保存
试剂三	粉剂×2 瓶	4℃保存
试剂四	粉剂×1 瓶	4℃保存
试剂五	液体 11mL×1 瓶	4℃保存
试剂六	粉剂×2 瓶	4℃保存
试剂七	液体 12mL×1 瓶	4℃保存
标准品	液体 1mL×1 支	4℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂一：临用前取一瓶加入 60mL 蒸馏水，充分溶解；用不完的试剂 4℃保存可保存 4 周；
- 2、试剂三：临用前取一瓶加入 6mL 蒸馏水，充分溶解；用不完的试剂-20℃分装保存 2 周，避免反复冻融；
- 3、试剂四：临用前加入 3mL 蒸馏水，充分溶解；用不完的试剂 4℃可保存 4 周；
- 4、试剂六：临用前取一瓶加入 6mL 蒸馏水，充分溶解；用不完的试剂 4℃密封保存可保存 4 周。

产品说明：

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。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。

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。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、**超速**离心机、水浴锅/恒温培养箱、研钵/匀浆器、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、粗酶液提取（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

- 1、**除去细胞核和线粒体等：**称约 0.5g 组织，加入 4℃预冷的 1mL 试剂一，冰上充分研磨，10 000g，4℃离心 30min，取上清液，转移到超速离心管中。
- 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 0.5mL 试剂二，盖紧后充分震荡溶解，即粗酶液，置于冰上待测。

二、测定步骤

- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 630nm，蒸馏水调零。
- 2、临用前根据实验用量取出部分试剂二在 37°C 水浴中预热 30min。
- 3、**试剂五置于冰浴冷却 30min。**
- 4、在 EP 管加入下列试剂：

试剂名称 (μL)	对照管	测定管	标准管
粗酶液	50	50	-
试剂三	100	100	-
试剂四	-	50	-
蒸馏水	50	-	-
涡旋混匀，置于 37°C 恒温培养箱/水浴锅中准确水浴 30min；			-
试剂五	100	100	-
涡旋混匀，置于冰浴中 5min；11000rpm，4°C 离心 10min；取 上清液 待测；			-
上清液	100	100	-
标准溶液	-	-	100
试剂六	100	100	100
试剂七	100	100	100
涡旋混匀，室温静置 30min；取出 200μL 至微量玻璃比色皿/96 孔板中，测定 630nm 下吸光度，分别记为 A 对照管、A 测定管、A 标准管；			

注：标准管只需测 1-2 次。每个测定管都需设一个对照管。

三、AH 活性计算

(1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义：37°C 条件下，每毫克蛋白每分钟催化产生 1nmol 4-氨基酚为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{AH 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= C \text{ 标} \times V \text{ 标} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \times F \div (C \text{ pr} \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 2 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \div C \text{ pr} \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：37°C 条件下，每克组织每分钟催化产生 1nmol 4-氨基酚为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{AH 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 质量}) &= C \text{ 标} \times V \text{ 标} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \times F \div (V \text{ 样} \times W) \div T \\ &= 2 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \div W \end{aligned}$$

C 标：10μmol/L；V 标：100μL=0.1mL；F：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；W：样本质量，g；T：催化反应时间，30min。

注意事项：

- 1、如果测定吸光值 A>1.5 或 ΔA>1，建议稀释样本后再测定，计算公式中乘以稀释倍数。
- 2、如果测定吸光值较低或接近空白 OD 值，建议增加样本量后再进行测定，注意同步修改计算公式。
- 3、粗酶液提取后需在当日完成测定。