



氨基比林-N-去甲基酶活性检测试剂盒

AND Assay Kit

微量法

产品编号: AK524M

产品规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK524-A	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加 100mL 蒸馏水充分溶解。
AK524-B	液体×1 瓶	4℃保存;
AK524-C	粉剂×1 瓶 (棕色瓶)	4℃避光保存; 临用前加入 1 mL 无水乙醇, 充分溶解。
AK524-D	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加入 0.5 mL 蒸馏水, 充分溶解。
AK524-E	粉剂×1 瓶	室温保存; 临用前加蒸馏水 4mL 充分溶解。
AK524-F	液体×1 瓶	室温保存;
AK524-G	液体×1 瓶	4℃保存;
AK524-S	液体×1 瓶	-20℃保存。临用前取 1.5 mL 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。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 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。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。

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。

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。

粗酶液提取:

1. **除去细胞核和线粒体等:** 称约 0.5g 组织, 加入 1 mL 4℃预冷的 AK524-A, 冰上充分研磨, 10 000g 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 1 mL AK524-A, 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 AK524-B 0.5 mL, 盖紧后充分震荡溶解, 4℃保存待测。
5. 该待测液需当天使用。

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. AK524-B 在 37℃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 (ul)
提取液	10	10	
AK524-B	170	170	

AK524-C	10	10	
蒸馏水	10		
AK524-D		10	
混匀后置于 37℃水浴保温 30min；立即加入			
AK524-E	35	35	
，混匀后置于冰浴中 5min；取出后加入			
AK524-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
AK524-G	100	100	100
混匀后 60℃水浴 10min，然后取出，用冷水冷却 5min，于 412nm 测定光吸收，分别记为 A 对照管、记为 A 测定管、A 标准管。			

注意：每个样品都需要做对照管。

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℃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℃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。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))

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℃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℃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 μ mol/L；V 标准品：500 μ 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，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒；V 样：加入粗酶液体积，50 μ 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℃保存；
2. AK524-C 和 AK524-D 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。