



苯胺-4-羟化酶活性检测试剂盒

AH Assay Kit

微量法

产品编号: AK525M

产品规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK525-A	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加 100mL 蒸馏水充分溶解。
AK525-B	液体×1 瓶	4℃保存;
AK525-C	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加入 10mL 蒸馏水, 充分溶解。
AK525-D	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加入 5mL 蒸馏水, 充分溶解。
AK525-E	液体×1 瓶	4℃保存;
AK525-F	粉剂×1 瓶	(腐蚀性试剂), 4℃避光保存; 临用前加入 10mL 蒸馏水, 充分溶解。
AK525-G	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加入 10mL 蒸馏水充分溶解。
AK525-S	液体×1 瓶	标准液 10μmol/L, 4℃避光保存。

※ 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。苯胺-4-羟化酶 (Aniline-4-hydroxylase, 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。

原理: AH 催化苯胺羟化后产生的 4-氨基酚, 进一步转变为酚-吲哚复合物, 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。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、普通离心机、超速离心机、双蒸水和冰。

粗酶液提取:

1. **除去细胞核和线粒体等大分子物质:** 称约 0.5g 组织, 加入 1 mL 4℃预冷的 AK525-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 AK525-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 AK525-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 630 nm, 蒸馏水调零。
2. AK525-C 在 37℃水浴中预热 30min。
3. AK525-E 置于冰浴预冷 30min。
4. 取 0.5 mL EP 依次加入下列试剂:

	对照管 (μL)	测定管 (μL)	标准管 (ul)
粗酶液	50	50	
AK525-C	100	100	

蒸馏水	50	50	
混匀后 37℃水浴中保温 30min;			
AK525-E	100	100	
混匀后冰浴 5min, 11000rpm, 4℃, 离心 10min; 取上清液加入新的 1.5 mL EP 管			
上清液	100	100	
标准品			100
AK525-F	100	100	100
AK525-G	100	100	100
混匀后室温静置 30min, 吸取 200μL 于微量玻璃比色皿/96 孔板, 630 nm 测定光吸收, 分别标记为 A 对照管、A 测定管、A 标准管。			

注意：每个样品都需要做对照管。

AH 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℃中每毫克蛋白每分钟催化产生 1nmol 4-氨基酚为 1 个酶活单位。

AH 活性 (nmol/min/mg prot)

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

$$= 2 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \div Cpr。$$

2. 按样本鲜重计算

活性单位定义：37℃中每克样本每分钟催化产生 1nmol 4-氨基酚为 1 个酶活单位。

AH 活性 (nmol/min/g 鲜重)

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

$$= 2 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \div W$$

注：C 标准品：10μmol/L；V 标准品：100μL=1×10⁻⁴L；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；W：样品质量；V 样：加入反应体系中粗酶液体积，50μL=0.05 mL；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℃中每毫克蛋白每分钟催化产生 1nmol 4-氨基酚为 1 个酶活单位。

AH 活性 (nmol/min/mg prot)

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

$$= 2 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \div Cpr$$

2. 按样本质量计算

活性单位定义：37℃中每克样本每分钟催化产生 1nmol 4-氨基酚为 1 个酶活单位。

AH 活性 (nmol/min/g 鲜重)

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

$$= 2 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \div W$$

注：C 标准品：10μmol/L；V 标准品：100μL=1×10⁻⁴L；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；W：样品质量；V 样：加入反应体系中粗酶液体积，50μL=0.05 mL；T：催化反应时间（min），30min。