



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 | 20ml×1 瓶 | 4℃保存; |
| AK524-C | 粉剂×1 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 | 35ml×1 瓶 | 室温保存; |
| AK524-G | 12ml×1 瓶 | 4℃保存; |
| AK524-标准液 | 1ml×1 瓶 (5mmol/L) | -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、微量玻璃比色皿/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:

- 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。
- 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 AK524-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 AK524-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。**

测定步骤:

- 分光光度计/酶标仪预热 30 min, 调节波长到 412 nm, 蒸馏水调零。
- AK524-B 在 37℃ 水浴中预热 30min。
- 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 | 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：每个样品都需要做对照管，标准管只需做 1-2 次。

AND 活性计算公式：

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 (U/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 (U/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=50000nmol/L；V 标准品：100μL=0.0001 L；稀释倍数：V 反总÷V 上清液=(10+170+10+10+35+35)÷10=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，10μL=0.01mL；W：样本质量，g；T：反应时间，30min。

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

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。