

苯胺-4-羟化酶（AH）活性测定试剂盒说明书

微量法 100管/48样

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

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。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。

测定原理：

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。

自备仪器和样品：

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

试剂组成和配制：

试剂一：粉剂×1瓶，4℃保存。临用前加入100mL蒸馏水，充分溶解。

试剂二：液体×1瓶，4℃保存。

试剂三：粉剂×1瓶，4℃保存。临用前加入10mL蒸馏水，充分溶解。

试剂四：粉剂×1瓶，4℃保存。临用前加入5mL蒸馏水，充分溶解。

试剂五：液体×1瓶，4℃保存。

试剂六：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。

试剂七：粉剂×1瓶，4℃保存。临用前加入10mL蒸馏水充分溶解。

标准液：液体×1瓶，10μmol/L，4℃避光保存。

粗酶液提取：

- 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：**100 000g 4℃，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的沉淀中加试剂二0.5mL，盖紧后充分震荡溶解，即粗酶液，待测。

测定操作：

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. 试剂三置于37℃水浴中预热30min。
3. 试剂五置于冰浴预冷30min。
4. **标准管：**取0.5 mL EP管，加入100μL标准液，100μL试剂六，100μL试剂七，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，记为A标准管。

5. **对照管**：取0.5 mL EP管，加入50 μ L粗酶液，100 μ L试剂三，50 μ L蒸馏水，混匀后37 $^{\circ}$ C水浴中保温30min；再加入100 μ L试剂五，混匀后冰浴5min，11000rpm，4 $^{\circ}$ C，离心10min；取100 μ L上清液，加入新的0.5 mL EP管；再加入100 μ L试剂六，100 μ L试剂七，混匀后室温静置30min，吸取200 μ L于微量玻璃比色皿/96孔板，630 nm测定光吸收，记为A对照管。

6. **测定管**：取0.5 mL EP管，加入50 μ L粗酶液，100 μ L试剂三，50 μ L试剂四，混匀后37 $^{\circ}$ C水浴中保温30min；再加入100 μ L试剂五，混匀后冰浴5min，11000rpm，4 $^{\circ}$ C，离心10min；取100 μ L上清液，加入新的0.5 mL EP管；再加入100 μ L试剂六，100 μ L试剂七，混匀后室温静置30min，吸取200 μ L于微量玻璃比色皿/96孔板，630 nm测定光吸收，记为A测定管。

苯胺-4-羟化酶（AH）活性测定试剂盒说明书_{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 $^{\circ}$ C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。

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

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：37 $^{\circ}$ C中每克样本每分钟催化产生1nmol 4-氨基酚为1个酶活单位。

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

C标准品：10 μ mol/L；V标准品：100 μ L=1 $\times 10^{-4}$ L；稀释倍数：V反总 \div V上清液=300 μ L \div 100 μ L=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，50 μ L=0.05 mL；T：催化反应时间（min），30min。

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 $^{\circ}$ C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。

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

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：37 $^{\circ}$ C中每克样本每分钟催化产生1nmol 4-氨基酚为1个酶活单位。

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

C标准品：10 μ mol/L；V标准品：100 μ L=1 $\times 10^{-4}$ L；稀释倍数：V反总 \div V上清液=300 μ L \div 100 μ L=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，50 μ L=0.05 mL；T：催化反应时间（min），30min。