

氨基比林-N-脱甲基酶（AND）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。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。

测定原理：

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。

自备仪器和样品：

普通离心机，超速离心机、水浴锅、可调式移液枪、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板、蒸馏水、无水乙醇和冰。

试剂组成和配制：

试剂一：粉剂×1瓶，4℃保存。临用前加100mL蒸馏水充分溶解。

试剂二：液体×1瓶，4℃保存。

试剂三：粉剂×1管，4℃避光保存。临用前加入1mL无水乙醇，充分溶解。

试剂四：粉剂×1管，4℃保存。临用前加入0.5mL蒸馏水，充分溶解。

试剂五：粉剂×1瓶，室温保存。临用前加蒸馏水4mL充分溶解。

试剂六：液体×1瓶，室温保存。

试剂七：液体×1瓶，4℃保存。

标准液：液体×1瓶，-20℃保存。临用前取1.5mL 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。

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1 mL试剂一，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的沉淀中加试剂二0.5 mL，盖紧后充分震荡溶解，即粗酶液，待测。该待测液需当天使用。

AND活性测定操作：

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. 试剂二置于37℃水浴中预热30min。
3. **对照管：**取1支EP管，加入10μL粗酶液，170μL试剂二，10μL试剂三，10μL蒸馏水，混匀后置于37℃水浴保温30min；立即加入35μL试剂五，混匀后置于冰浴中5min；取出后加入35μL试剂六，混匀后室温静置5min；室温8000rpm离心5min；取新的EP管，加入100μL上清液，100μL试剂七，混匀后60℃水浴10min，然后取出，用冷水冷却5min，于412nm测定光吸收，记为A对照管。
4. **测定管：**取1支EP管，加入10μL粗酶液，170μL试剂二，10μL试剂三，10μL试剂四，混匀后置于37℃水浴保温30min；立即加入35μL试剂

五，混匀后置于冰浴中5min；取出后加入35 μ L试剂六，混匀后室温静置5min；室温8000rpm离心5min；取1支新EP管，加入100 μ L上清液，100 μ L试剂七，混匀后60 $^{\circ}$ C水浴10min，然后取出，用冷水冷却5min，于412nm测定光吸收，记为A测定管。

5. **标准管**：取1支EP管，加入100 μ L标准品，100 μ L试剂七，混匀后60 $^{\circ}$ C水浴10min，然后取出，用冷水冷却5min，于412nm测定光吸收，记为A标准管。

氨基比林-N-脱甲基酶（AND）活性测定试剂盒说明书注意：每个样品都需要做对照管。

AND活性计算：

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中每分钟每毫克蛋白催化产生1nmol甲醛为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{AND活性(nmol/min/mg prot)} &= C_{\text{标准品}} \times V_{\text{标准品}} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div A_{\text{标准管}} \times \text{稀释倍数} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 45 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div A_{\text{标准管}} \div C_{\text{pr}}. \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：37 $^{\circ}$ C中每分钟每克组织催化产生1nmol甲醛为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{AND活性(nmol/min/g 鲜重)} &= C_{\text{标准品}} \times V_{\text{标准品}} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div A_{\text{标准管}} \times \text{稀释倍数} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 45 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div A_{\text{标准管}} \div W. \end{aligned}$$

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，0.5mL；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中每分钟每毫克蛋白催化产生1nmol甲醛为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{AND活性(nmol/min/mg prot)} &= C_{\text{标准品}} \times V_{\text{标准品}} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div A_{\text{标准管}} \times \text{稀释倍数} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 45 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div A_{\text{标准管}} \div C_{\text{pr}}. \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：37 $^{\circ}$ C中每分钟每克组织催化产生1nmol甲醛为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{AND活性(nmol/min/g 鲜重)} &= C_{\text{标准品}} \times V_{\text{标准品}} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div A_{\text{标准管}} \times \text{稀释倍数} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 45 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div A_{\text{标准管}} \div W. \end{aligned}$$

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 $^{\circ}$ C保存；
 - 2、试剂三和试剂四需临用前配制，如当天没有用完，4 $^{\circ}$ C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。
-

