

苯胺-4-羟化酶 (AH) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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。

组成：

产品名称	CP005-50T/24S	Storage
试剂一：粉剂	1 瓶	4°C
试剂二：液体	1 瓶	4°C
试剂三：粉剂	1 瓶	4°C
试剂四：粉剂	1 瓶	4°C
试剂五：液体	1 瓶	4°C
试剂六：粉剂	1 瓶	4°C避光
试剂七：粉剂	1 瓶	4°C
标准液：液体	1 瓶	4°C避光
说明书	一份	

试剂一：粉剂×1 瓶，4°C保存。临用前加入 50ml 蒸馏水，充分溶解。

试剂三：粉剂×1 瓶，4°C保存。临用前加入 26ml 蒸馏水，充分溶解。

试剂四：粉剂×1 瓶，4°C保存。临用前加入 13ml 蒸馏水，充分溶解。

试剂六：粉剂×1 瓶（腐蚀性试剂），4°C避光保存。临用前加入 26ml 蒸馏水，充分溶解。

试剂七：粉剂×1 瓶，4°C保存。临用前加入 26ml 蒸馏水充分溶解。

标准液：液体×1 瓶，10μmol/L，4°C避光保存。



自备仪器和用品：

可见分光光度计、普通离心机、**超速离心机**、可调式移液枪、1ml 玻璃比色皿、双蒸水和冰。

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°C，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°C，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. 分光光度计预热 30 min，调节波长到 630 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂三置于 37°C 水浴中预热 30min。
3. 试剂五置于冰浴预冷 30min。
4. 标准管：取 1.5ml EP 管，加入 500μl 标准液，500μl 试剂六，500μl 试剂七，混匀后室温静置 30min，于 630 nm 测定光吸收，记为 A 标准管。
5. 对照管：取 1 支 1.5ml EP 管，加入 250μl 粗酶液，500μl 试剂三，250μl 蒸馏水，混匀后 37°C 水浴中保温 30min；再加入 500μl 试剂五，混匀后冰浴 5min，11000rpm，4°C，离心 10min；取 500μl 上清液，加入 1 支新的 1.5ml EP 管；再加入 500μl 试剂六，500μl 试剂七，混匀后室温静置 30min，于 630 nm 测定光吸收，记为 A 对照管。
6. 测定管：取 1 支 1.5ml EP 管，加入 250μl 粗酶液，500μl 试剂三，250μl 试剂四，混匀后 37°C 水浴中保温 30min；再加入 500μl 试剂五，混匀后冰浴 5min，11000rpm，4°C，离心 10min；取 500μl 上清液，加入 1 支新的 1.5ml EP 管；再加入 500μl 试剂六，500μl 试剂七，混匀后室温静置 30min，于 630 nm 测定光吸收，记为 A 测定管。

AH 活性计算公式：

(1) 按照蛋白浓度计算：

活性单位定义：37°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。

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

(2) 按照样本质量计算：

活性单位定义：37°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。

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

C 标准品：10μmol/L；V 标准品：500μl=0.0005L；稀释倍数：V 反总÷V 上清液=1500μl÷500μl=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；V 样：加入反应体系中粗酶液体积，250μl=0.25ml；W：样本质量，g；T：反应时间，30min。

