

苯胺-4-羟化酶 (AH) 活性测定试剂盒说明书

微量法 100 管/48 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-吡啶复合物，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	CP006-100T/48S	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 100ml 蒸馏水，充分溶解。

试剂三：粉剂×1 瓶，4°C保存。临用前加入 10ml 蒸馏水，充分溶解。

试剂四：粉剂×1 瓶，4°C保存。临用前加入 5ml 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 10ml 蒸馏水，充分溶解。

试剂七：粉剂×1 瓶，4°C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°C避光保存。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



自备仪器和用品：

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。

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 50μl 粗酶液，100μl 试剂三，50μl 蒸馏水，混匀后 37℃水浴中保温 30min；再加入 100μl 试剂五，混匀后冰浴 5min，11000rpm，4℃，离心 10min；取 100μl 上清液，加入新的 0.5 ml EP 管；再加入 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 对照管。
6. **测定管：**取 0.5 ml EP 管，加入 50μl 粗酶液，100μl 试剂三，50μl 试剂四，混匀后 37℃水浴中保温 30min；再加入 100μl 试剂五，混匀后冰浴 5min，11000rpm，4℃，离心 10min；取 100μl 上清液，加入新的 0.5 ml EP 管；再加入 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 测定管。

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。

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

(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。

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

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。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司，保留一切权利



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

