

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-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。

自备仪器及用品：

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。

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，10 μmol/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。

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。

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

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：37 $^{\circ}$ 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。

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

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。

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

(2) 按样本质量计算

活性单位定义：37 $^{\circ}$ 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。

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

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。