

# 芳基酰胺酶活性测定试剂盒

微板法 96 样

## 产品简介:

芳基酰胺酶(aryl-acylamidase) (EC 3. 5. 1.3), 广泛存在于动物、植物、微生物中, 可水解带有酰胺基团的化合物, 是生物体内农药及其他外源物质的重要水解酶之一。

本试剂盒采用芳基酰胺酶水解底物产生对硝基苯胺, 在波长 405nm 处有大吸收峰, 通过检测生成的产物对硝基苯胺在 405nm 处的增长速率即可得出该酶活性大小。

## 试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 125 mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体 4 mL×1 支	4°C 保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4°C 保存	若重新做标曲则用到该试剂。

## 所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、离心机、可调式移液器、研钵、乙醇、冰和蒸馏水。

## 芳基酰胺酶活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

### 1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一，进行冰浴匀浆。4°C×12000rpm 离心 15min，取上清，置冰上待测。

**[注]**：若增加样本量，可按照组织质量(g)：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

**[注]**：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10<sup>4</sup>）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

**2、上机检测：**

① 酶标仪预热 30 min 以上，调节波长到 405nm。

② 所有试剂解冻至室温（25°C）。

③ 为了减少操作误差，建议使用排枪。

④ 依次在 96 孔板中加入：

试剂名称	测定管
试剂一	120
样本	40
试剂二	40

混匀，立即于 405nm 处读取 A1 值，37°C 反应 30min 后读取 A2 值。

$$\Delta A = A2 - A1。$$

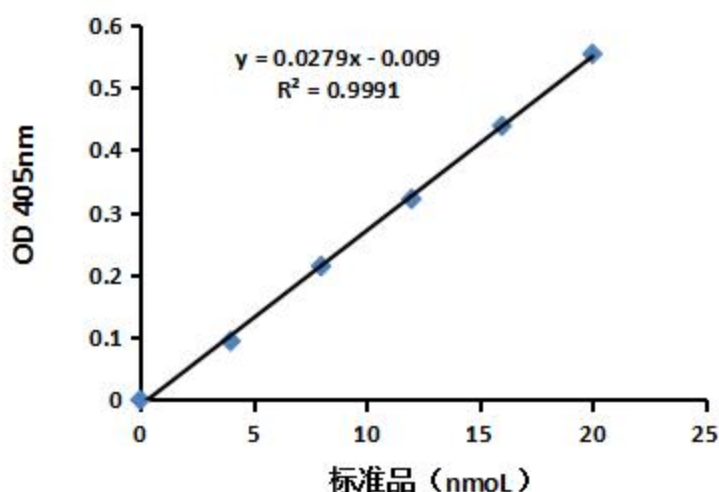
**[注]**：1. 加完试剂二即启动反应，所以试剂二加完混匀后立即检测，若 A2 值大于 1.5，

可对样本进行稀释，稀释倍数需代入公式重新计算。

2. 若 $\Delta A$  小于 0.005，可增大样本量  $V_1$ （如增至  $80\mu\text{L}$ ，试剂—相应减少），则改变后的  $V_1$  需代入公式重新计算。

## 结果计算:

1、标准曲线:  $y = 0.0279x - 0.009$ :  $x$  为标准品(nmol),  $y$  为 $\Delta A$ 。



2、按样本鲜重计算:

单位定义: 在  $37^{\circ}\text{C}$ ，每克组织每分钟催化产生 1nmol 标准品定义为一个酶活单位 (U)。

芳基酰胺酶(nmol/min/g 鲜重) =  $[(\Delta A + 0.009) \div 0.0279] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 29.87 \times (\Delta A + 0.009) \div W$

3、按样本鲜重计算:

单位定义: 在  $37^{\circ}\text{C}$ ，每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1nmol 标准品定义为一个酶活单位 (U)。

芳基酰胺酶(nmol/min/mg prot) =  $[(\Delta A + 0.009) \div 0.0279] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T = 29.87 \times (\Delta A + 0.009) \div \text{Cpr}$

4、按细胞数量计算:

酶活定义：在 37°C，每 104 个细胞每分钟催化产生 1nmol 标准品定义为一个酶活单位 (U)。

芳基酰胺酶(nmol/min/104 cell) =  $[(\Delta A + 0.009) \div 0.0279] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.06 \times (\Delta A + 0.009)$

#### 5、按照液体体积计算：

单位定义：在 37°C，每毫升液体每分钟催化产生 1nmol 标准品定义为一个酶活单位 (U)。

芳基酰胺酶(nmol/min/mL) =  $[(\Delta A + 0.009) \div 0.0279] \div V1 \div T = 29.87 \times (\Delta A + 0.009)$

V---加入提取液体积，1 mL； V1---加入样本体积，0.04mL；

T---反应时间，30min； W---样本质量，g；

500---细胞数量；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

#### 附：标准曲线制作过程：

1 制备标准品母液 (10 $\mu$ mol/mL)：临用前甩几下或离心，使粉体落入底部，加入 0.1mL

乙醇，涡旋震荡溶解后再加入 0.9mL 的蒸馏水混匀，得到 10 $\mu$ mol/mL 备用。

2 用蒸馏水把母液稀释成以下浓度：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 $\mu$ mol/mL。也可根据实际来调整浓度。

3 40 $\mu$ L 标准品+160 $\mu$ L 试剂一，混匀后于 405nm 处读取 A 值，依据结果即可制作标准曲线。