

芳基酰胺酶活性测定试剂盒说明书

(分光法 48 样)

一、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 处有最大吸收峰。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。

二、测试盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 8mL×1 支	4°C保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4°C保存	若要重新做标曲则用到该试剂。

三、所
仪器
品:

需的
和用

可见分光光度计、1mL玻璃比色皿(光径1cm)、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、乙醇、冰和蒸馏水。

四、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(水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4°C×12000rpm 离心 10min, 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(10^4): 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 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 405nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温(25°C)。

③ 在 1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)中依次加入:

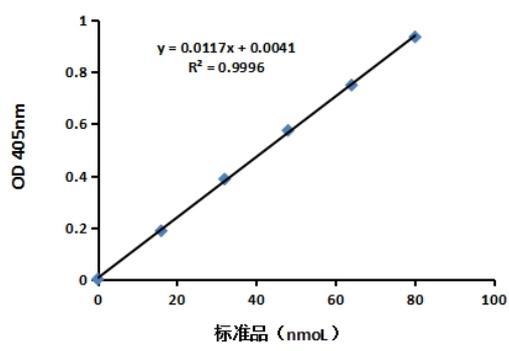
试剂名称(μL)	测定管
试剂一	480
样本	160
试剂二	160
混匀, 立即于 405nm 处读取 A1 值, 37°C 反应 30min 后读取 A2 值。ΔA=A2-A1。	

【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 ΔA 小于 0.005, 可增大样本量 V1 (如增至 320μL, 试剂一相应减少), 则改变后的 V1 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.0117x + 0.0041$ ；x 为标准品(nmoL)，y 为 ΔA 。



2、按样本鲜重计算：

酶活定义：在 37°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）。

$$\begin{aligned} \text{芳基酰胺酶}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A - 0.0041) \div 0.0117] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 17.806 \times (\Delta A - 0.0041) \div W \end{aligned}$$

3、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：在 37°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）。

$$\begin{aligned} \text{芳基酰胺酶}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A - 0.0041) \div 0.0117] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 17.806 \times (\Delta A - 0.0041) \div Cpr \end{aligned}$$

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）。

$$\text{芳基酰胺酶}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A - 0.0041) \div 0.0117] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.0356 \times (\Delta A - 0.0041)$$

5、按照液体体积计算：

酶活定义：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）。

$$\text{芳基酰胺酶}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A - 0.0041) \div 0.0117] \div V1 \div T = 17.806 \times (\Delta A - 0.0041)$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.16mL；

T---反应时间，30min；

W---样本质量，g；

500---细胞数量，万；

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（50 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ）：临用前甩几下或离心，使粉体落入底部，加入 0.5mL 乙醇，涡旋震荡溶解后再加入 0.5mL 的蒸馏水混匀，得到 50 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。也可根据实际来调整浓度。
- 3 160 μL 标准品+640 μL 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。