

芳基酰胺酶活性测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-N024 微板法 96 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 125mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉体 1 支	4°C保存	临用前加 4ml 无水乙醇
标准品	粉体 1 支	4°C保存	若要重新做标曲则用到该试剂。

三、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。

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, 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 试剂一, 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 (10⁴): 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 (μL)	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。ΔA=A2-A1。	

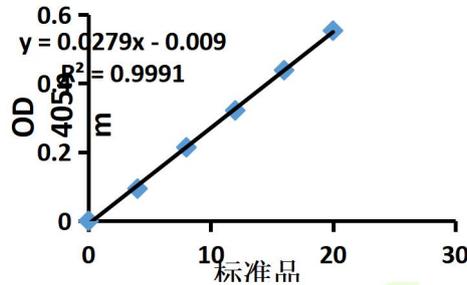
【注】1. 加完试剂二即启动反应, 所以试剂二加完混匀后立即检测, 若 A2 值大于 1.5, 可对样本进行稀释, 稀释倍数需

代入公式重新计算。

2. 若 ΔA 小于0.005, 可增大样本量 V_1 (如增至80 μL , 试剂一相应减少), 则改变后的 V_1 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 0.0279x - 0.009$: x 为标准品(nmoL), y 为 ΔA 。



2、按样本鲜重计算:

单位定义: 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)。

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、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 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)。

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

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)=[$(\Delta A+0.009)\div 0.0279$] $\div (500\times V_1\div V)\div T=0.06\times(\Delta A+0.009)$

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)=[$(\Delta A+0.009)\div 0.0279$] $\div V_1\div T=29.87\times(\Delta A+0.009)$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V_1 ---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;

C_{pr} ---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 $\mu\text{mol/mL}$): 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 $\mu\text{mol/mL}$ 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 $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际来调整浓度。
- 3 40 μL 标准品+160 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。