

## 碳酸酐酶（CA）活性测定试剂盒说明书

（货号：ADS-W-GH019 微板法 96 样 有效期：6 个月）

### 一、指标介绍：

碳酸酐酶（Carbonic Anhydrase，CA，EC 4.2.1.1）是一种含锌的金属酶，碳酸酐酶的结构多样，但都含有一个活性中心，其中锌离子（Zn<sup>2+</sup>）是其发挥催化作用的关键。

本试剂盒采用碳酸酐酶与乙酸对硝基苯酯反应，生成对硝基苯酚（PNP），在 405nm 处有最大吸光值，通过上升速率反映碳酸酐酶的活性。

### 二、试剂盒的组成和配制：

| 试剂组分 | 试剂规格         | 存放温度   | 注意事项                                                                           |
|------|--------------|--------|--------------------------------------------------------------------------------|
| 提取液  | 液体 110mL×1 瓶 | 4℃避光保存 |                                                                                |
| 试剂一  | 液体 20mL×1 瓶  | 4℃避光保存 |                                                                                |
| 试剂二  | 粉剂 2 支       | 4℃避光保存 | 每支：<br>1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）；<br>2. 加入 2mL 无水乙醇混匀，现配现用，一周内用完。 |
| 标准品  | 粉剂 1 支       | 4℃避光保存 | 1. 若重新做标曲，则用到该试剂；<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制；<br>3. 溶解后的标品一周内用完。                   |

### 三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、无水乙醇、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

### 四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

#### 1、样本提取：

- ① 组织样本：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℃×12000rpm 离心 15min，取上清液待测。

【注】：①若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例提取

- ② 样本提取，当天准备当天测定。且样本中应避免酒石酸盐，氟化物，EDTA，草酸盐和柠檬酸盐等物质，因其对酸性磷酸酶的活性有抑制作用。

- 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℃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：可直接测定，或者适当稀释后测定。若浑浊，离心后取上清检测。

#### 2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30 min（过自检程序亦可），设置温度 37℃，调节波长为 405nm。
- ② 所有试剂于冰箱取出后恢复室温待用。
- ③ 在 96 孔板中依次加入下列试剂：

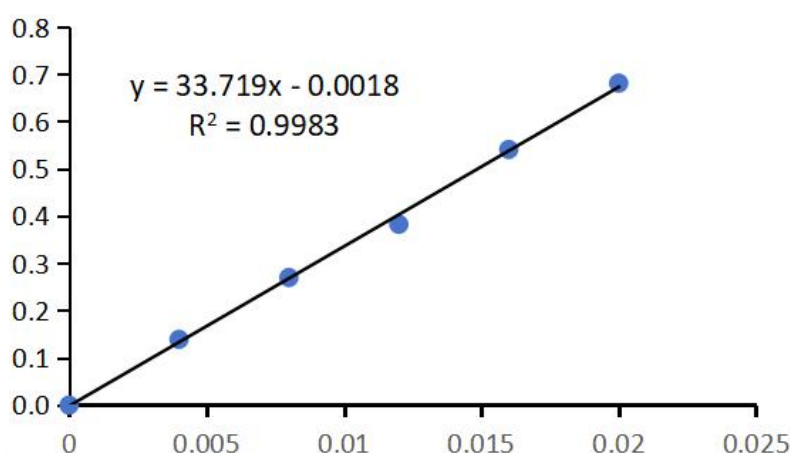
| 试剂组分 (μL)                                                                        | 测定管 |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 样本                                                                               | 20  |
| 试剂一                                                                              | 140 |
| 试剂二                                                                              | 40  |
| 混匀后立即于405nm 处读取吸光值 A1，在再 37℃下静置 5min，立即于 405nm 下读取吸光值 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。 |     |

【注】：① 若 $\Delta A$ 的值非常低在零附近，可增加样本量 V1（如增至 40μL，则试剂一相应减少）或延长反应时间 T（如增至 30min 或更长），则重新调整的 V1 和 T 须代入公式重新计算。

② 若 $\Delta A$ 的值超过 1，则需要用蒸馏水稀释样本，稀释倍数 D 代入计算公式。

## 五、结果计算：

1、标准曲线：y = 33.719x - 0.0018，x 是 PNP 摩尔质量：μmol；y 是 $\Delta A$ 。



2、按照样本质量计算：

酶活定义：在 37℃下，每克组织每分钟水解 1μmol PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$CA (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0018) \div 33.719] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 0.2966 \times (\Delta A + 0.0018) \div W \times D$$

3、按照样本蛋白浓度计算：

酶活定义：在 37℃下，每毫克蛋白每分钟水解 1μmol PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$CA (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0018) \div 33.719] \div (Cpr \times V1) \div T \times D = 0.2966 \times (\Delta A + 0.0018) \div Cpr \times D$$

4、按细菌/细胞数量计算：

酶活定义：在 37℃下，每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟水解 1nmol PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$CA (\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0018) \div 33.719] \times 10^3 \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ = 0.593 \times (\Delta A + 0.0018) \times D$$

5、按液体体积计算：

酶活定义：在 37℃下，每毫升液体每分钟水解 1μmol PNPP 产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$CA \text{ 活力} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0018) \div 33.719] \div V1 \div T = 0.2966 \times (\Delta A + 0.0018)$$

W---样品质量，g；

V---提取液体积，1 mL；

V1---上清液体积 (mL)，0.02mL；

T---反应时间，5 min。

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

500---细胞数量，万；

Cpr---上清液蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 向标准品 EP 管里面加入 1.4mL 蒸馏水超声溶解，若有结晶析出，需 37°C 水浴至完全溶解。标准品母液浓度为 10 $\mu$ mol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0  $\mu$ mol/ml。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下：

|                                                          |     |     |     |     |     |     |
|----------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 吸取标准品母液 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 1 $\mu$ mol/mL 的标品稀释液待用。 |     |     |     |     |     |     |
| 标品浓度<br>$\mu$ mol/mL                                     | 0   | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1   |
| 标品稀释液<br>uL                                              | 0   | 40  | 80  | 120 | 160 | 200 |
| 水 uL                                                     | 200 | 160 | 120 | 80  | 40  | 0   |
| 各标准管混匀待用。                                                |     |     |     |     |     |     |

- 3 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

| 试剂名称 ( $\mu$ L)                                                                            | 标准管 | 0 浓度管 (仅做一次) |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----|--------------|
| 标品                                                                                         | 20  |              |
| 蒸馏水                                                                                        |     | 60           |
| 试剂一                                                                                        | 140 | 140          |
| 蒸馏水                                                                                        | 40  |              |
| 混匀，在 37°C 下静置 5min，立即于 405nm 下读取吸光值 A，<br>$\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{0 \text{ 浓度管}}$ 。 |     |              |