

苯胺-4-羟化酶 (AH) 检测试剂盒 (分光光度法)

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。

试剂组成和配制：

试剂一：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加入 50 mL 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 26 mL 蒸馏水，充分溶解。

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加入 13 mL 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 26 mL 蒸馏水，充分溶解。

试剂七：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加入 26 mL 蒸馏水充分溶解。

标准液：液体×1 瓶，10μmol/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。

测定步骤：

1. 分光光度计预热 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 1.5 mL EP 管, 加入 500μL 标准液, 500μL 试剂六, 500μL 试剂七, 混匀后室温静置 30min, 于 630 nm 测定光吸收, 记为 A 标准管。
5. **对照管**: 取 1 支 1.5 mL EP 管, 加入 250μL 粗酶液, 500μL 试剂三, **250μL 蒸馏水**, 混匀后 37℃ 水浴中保温 30min; 再加入 500μL 试剂五, 混匀后冰浴 5min, 11000rpm, 4℃, 离心 10min; 取 500μL 上清液, 加入 1 支新的 1.5 mL EP 管; 再加入 500μL 试剂六, 500μL 试剂七, 混匀后室温静置 30min, 于 630 nm 测定光吸收, 记为 A 对照管。
6. **测定管**: 取 1 支 1.5 mL EP 管, 加入 250μL 粗酶液, 500μL 试剂三, **250μL 试剂四**, 混匀后 37℃ 水浴中保温 30min; 再加入 500μL 试剂五, 混匀后冰浴 5min, 11000rpm, 4℃, 离心 10min; 取 500μL 上清液, 加入 1 支新的 1.5 mL EP 管; 再加入 500μL 试剂六, 500μL 试剂七, 混匀后室温静置 30min, 于 630 nm 测定光吸收, 记为 A 测定管。

AH 活性计算公式:

- (1) 按照蛋白浓度计算:

活性单位定义: 37℃ 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。

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

- (2) 按照样本质量计算:

活性单位定义: 37℃ 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: 10μmol/L;

V 标准品: 500μL=0.0005L;

稀释倍数: V 反总÷V 上清液=1500μL÷500μL=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;

V 样: 加入反应体系中粗酶液体积, 250μL=0.25 mL;

W: 样本质量, g;

T: 反应时间, 30min。