

氨基比林-N-去甲基酶（AND）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 酶是一组在外源物质代谢中，尤其是药物和毒物，具有重要作用的酶系。AND 作为 P450 酶系的重要一员，相当于 CYP3A4 亚型，与药物的去甲基化反应密切相关。

测定原理：

AND 催化氨基比林释放甲醛，通过 Nash 比色法测定甲醛含量，即可计算出 AND 活性。

试剂组成和配制：

试剂一：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加 50mL 蒸馏水充分溶解。

试剂二：液体×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：粉剂×1 瓶（棕色瓶），4℃ 避光保存。临用前加入 2.6 mL 无水乙醇，充分溶解。

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加入 2.6 mL 蒸馏水，充分溶解。

试剂五：粉剂×1 瓶，室温保存。临用前加蒸馏水 10mL 充分溶解。

试剂六：液体×1 瓶，室温保存。

试剂七：液体×1 瓶，4℃ 保存。

标准液：液体×1 瓶，-20℃ 保存。临用前取 1.5 mL EP 管，加入 10μl 标准液，加 990μl 蒸馏水，混匀即为 0.05 mmol/L 标准甲醛溶液，4℃ 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 1 mL 试剂一，冰上充分研磨，10 000g 4℃ 离心 30min，取上清液转入超速离心管。
- 2、粗制微粒体：**4℃，100 000g，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 0.5 mL，盖紧后充分震荡溶解，即粗酶液，待测。该待测液需当天使用。

AND 活性测定步骤：

1. 分光光度计预热 30 min，调节波长到 412 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂二置于 37℃ 水浴中预热 30min。
3. **对照管：**取 1 支 EP 管，加入 50μL 粗酶液，850μL 试剂二，50μL 试剂三，50μL 蒸馏水，混匀后置于 37℃ 水浴保温 30min；立即加入 175μL 试剂五，混匀后置于冰浴中 5min；取出后加入 175μL 试剂六，

混匀后室温静置 5min；室温 8000rpm 离心 5min；取新的 EP 管，加入 500 μ L 上清液，500 μ L 试剂七，混匀后 60 $^{\circ}$ C 水浴 10min，然后取出，用冷水冷却 5min，于 412nm 测定光吸收，记为 A 对照管。

4. **测定管**：取 1 支 EP 管，加入 50 μ L 粗酶液，850 μ L 试剂二，50 μ L 试剂三，**50 μ L 试剂四**，混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 30min；立即加入 175 μ L 试剂五，混匀后置于冰浴中 5min；取出后加入 175 μ L 试剂六，混匀后室温静置 5min；室温 8000rpm 离心 5min；取 1 支新 EP 管，加入 500 μ L 上清液，500 μ L 试剂七，混匀后 60 $^{\circ}$ C 水浴 10min，然后取出，用冷水冷却 5min，于 412nm 测定光吸收，记为 A 测定管。
5. **标准管**：取 1 支 EP 管，加入 500 μ L 标准品，500 μ L 试剂七，混匀后 60 $^{\circ}$ C 水浴 10min，然后取出，用冷水冷却 5min，于 412nm 测定光吸收，记为 A 标准管。

注意：每个样品都需要做对照管。

AND 活性计算：

(1).按照蛋白浓度计算：

活性单位定义：37 $^{\circ}$ C 中每分钟每毫克蛋白催化产生 1nmol 甲醛为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{AND 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \times \text{稀释倍数} \div \\ &\quad (Cpr \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 45 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div A \text{ 标准管} \div Cpr \end{aligned}$$

(2).按照样本质量计算：

活性单位定义：37 $^{\circ}$ C 中每分钟每克样品催化产生 1nmol 甲醛为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{AND 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \times \text{稀释倍数} \div (W \times V \\ &\quad \text{样}) \div T \\ &= 45 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \div W \end{aligned}$$

C 标准品：0.05 mmol/L=50 μ mol/L；

V 标准品：500 μ L=0.0005 L；

稀释倍数：V 反总 \div V 上清液= (50+850 +50+50+175+175) \div 500=2.7；

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：加入粗酶液体积，50 μ L=0.05mL；

W：样本质量，g ；

T：反应时间，30min。

注意事项：

- 1、粗酶液需在当日完成测定，如需保存，则向粗酶液提取步骤 3 的沉淀中加 0.5ml 20%的甘油，分装后，-80 $^{\circ}$ C 保存；
- 2、试剂三和试剂四需临用前配制，如当天没有用完，4 $^{\circ}$ C 避光保存，可用 1 周；
- 3、粗酶液可直接用于蛋白浓度测定，建议用 BCA 法测蛋白含量。