

芳基酰胺酶活性测定试剂盒

(微板法 96 样)

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。

试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 125mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 4mL×1 支	4℃保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲则用到该试剂。

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。

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℃×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 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 (10^4)：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 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℃）。

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：

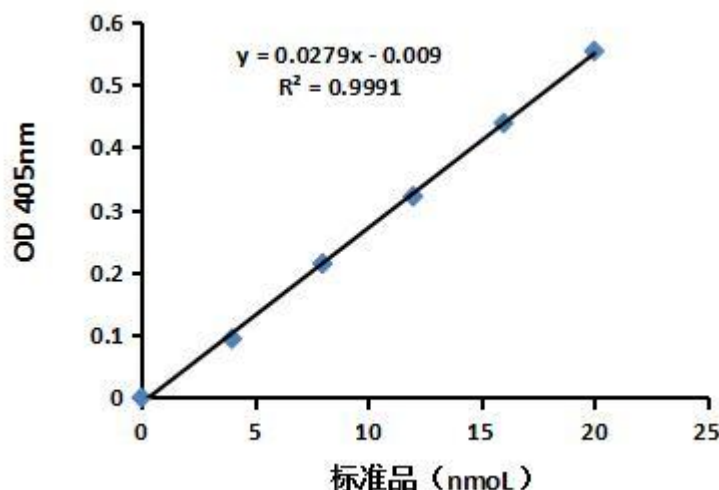
试剂名称	测定管
试剂 一	120
样 本	40
试剂 二	40
混匀，立即于 405nm 处读取 A1 值，37℃反应 30min 后读取 A2 值。 $\Delta A=A2-A1$ 。	

【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 80 μ L，试剂一相应减少），则改变后的 V1 需代入公式重新计算。

结果计算:

1、**标准曲线:** $y = 0.0279x - 0.009$: x 为标准品(nmolL), 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 $\times$ V1 $\div$ 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)= $[(\Delta A + 0.009) \div 0.0279] \div (V1 \times Cpr) \div T = 29.87 \times (\Delta A + 0.009) \div Cpr$

4、按细胞数量计算：

酶活定义：在 37℃，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)= $[(\Delta A + 0.009) \div 0.0279] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.06 \times (\Delta A + 0.009)$

5、按照液体体积计算：

单位定义：在 37℃，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)= $[(\Delta A + 0.009) \div 0.0279] \div V1 \div T = 29.87 \times (\Delta A + 0.009)$

V---加入提取液体积，1 mL； V1---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；

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 (10μmol/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 10μmol/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, 0.5μmol/mL。也可根据实际来调整浓度。

3 40μL 标准品+160μL 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。