



## 苯胺-4 羟化酶(AH)活性检测试剂盒(微量法)

中文名称：**ATP 含量检测试剂盒(WST 显色法)**

英文名称：Aniline-4 hydroxylase(AH) Activity Assay Kit

产品别名：L-乳酸含量试剂盒 LAKit 乳酸含量(LA)试剂盒乳酸含量(LA)测试盒

产品包装：盒装

产品规格：100 管/48 样

储存条件：-20°C

检测方法：微量法

有效期：6 个月

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	粉剂×2 瓶	4°C保存
试剂二	液体 30mL×1 瓶	4°C保存
试剂三	粉剂×2 瓶	4°C保存
试剂四	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂五	液体 11mL×1 瓶	4°C保存
试剂六	粉剂×2 瓶	4°C保存
试剂七	液体 12mL×1 瓶	4°C保存
标准品	液体 1mL×1 支	4°C保存

溶液的配制：

1、试剂一：临用前取一瓶加入 60mL 蒸馏水，充分溶解；用不完的试剂 4°C保存可保存 4



周；

2、试剂三：临用前取一瓶加入 6mL 蒸馏水，充分溶解；用不完的试剂-20℃分装保存 2 周，避免反复冻融；

3、试剂四：临用前加入 3mL 蒸馏水，充分溶解；用不完的试剂 4℃可保存 4 周；

4、试剂六：临用前取一瓶加入 6mL 蒸馏水，充分溶解；用不完的试剂 4℃密封保存可保存 4 周。

### 产品说明：

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。

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。

**注意：**实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

### 需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、超速离心机、水浴锅/恒温培养箱、研钵/匀浆器、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、冰和蒸馏水。

### 操作步骤：

#### 一、粗酶液提取

1、除去细胞核和线粒体等：称约 0.5g 组织，加入 4℃预冷的 1mL 试剂一，冰上充分研磨，10000g，4℃离心 30min，取上清液，转移到超速离心管中。

2、粗制微粒体：4℃，100000g，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，100000g 离心 30min，弃上清液。

4、微粒体：向步骤 3 的沉淀中加 0.5mL 试剂二，盖紧后充分震荡溶解，即粗酶液，置于冰上待测。

## 二、测定步骤

1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 630nm，蒸馏水调零。

2、临用前根据实验用量取出部分试剂二在 37°C 水浴中预热 30min。

3、试剂五置于冰浴冷却 30min。

3、操作表：(按下表在 1.5mLEP 管中加入相应试剂)

### 4、在 EP 管加入下列试剂：

试剂名称(μL)	对照管	测定管	标准管
粗酶液	50	50	-
试剂三	100	100	-
试剂四	-	50	-
蒸馏水	50	-	-
涡旋混匀，置于 37°C 恒温培养箱/水浴锅中准确水浴 30min；			
试剂五	100	100	-
涡旋混匀，置于冰浴中 5min；11000rpm，4°C 离心 10min；取上清液待测；			
上清液	100	100	-
标准溶液	-	-	100
试剂六	100	100	100
试剂七	100	100	100
涡旋混匀，室温静置 30min；取出 200μL 至微量玻璃比色皿/96 孔板中，测定 630nm 下吸光度，分别记为 A 对照管、A 测定管、A 标准管；			

注：标准管只需测 1-2 次。每个测定管都需设一个对照管。

## 三、AH 活性计算



### (1) 按蛋白浓度计算

活性单位定义：37°C条件下，每毫克蛋白每分钟催化产生 1nmol 4-氨基酚为 1 个酶活单位。

$$\text{AH 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = \text{C 标} \times \text{V 标} \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div \text{A 标准管} \times \text{F} \div (\text{Cpr} \times \text{V 样}) \div \text{T} = 2 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div \text{A 标准管} \div \text{Cpr}$$

### (2) 按样本质量计算

活性单位定义：37°C条件下，每克组织每分钟催化产生 1nmol 4-氨基酚为 1 个酶活单位。

$$\text{AH 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 质量}) = \text{C 标} \times \text{V 标} \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div \text{A 标准管} \times \text{F} \div (\text{V 样} \times \text{W}) \div \text{T} = 2 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div \text{A 标准管} \div \text{W}$$

C 标：10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ；V 标：100 $\mu\text{L}$ =0.1mL；F：稀释倍数，V 反总 $\div$ V 上清液=300 $\mu\text{L}$  $\div$ 100 $\mu\text{L}$ =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：加入粗酶液体积，50 $\mu\text{L}$ =0.05mL；W：样本质量，g；T：催化反应时间，30min。

### 注意事项：

- 1、如果测定吸光值  $A > 1.5$  或  $\Delta A > 1$ ，建议稀释样本后再测定，计算公式中乘以稀释倍数。
- 2、如果测定吸光值较低或接近空白 OD 值，建议增加样本量后再进行测定，注意同步修改计算公式。
- 3、粗酶液提取后需在当日完成测定。