

芳基酰胺酶活性测定试剂盒说明书

(货号: BP10374W 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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。

二、测试盒组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 125mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 1 瓶	-20℃避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 临用前加 4ml 无水乙醇溶解; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉体 1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 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、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:

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 试剂一, 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 (10⁴): 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、检测步骤:

- 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：

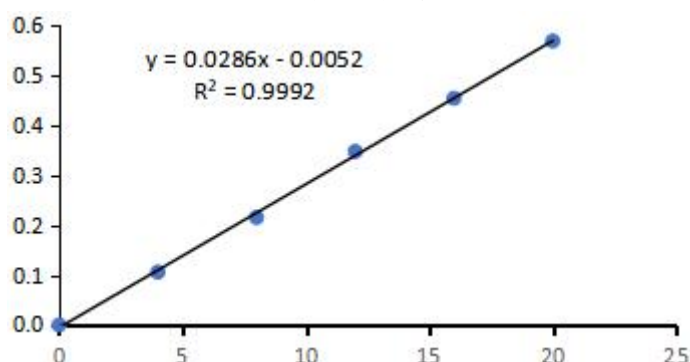
试剂组分 (μL)	测定管
试剂一	120
样本	40
试剂二	40
混匀，立即于 405nm 处读取 A1 值，37℃反应 30min 后读取 A2 值。ΔA=A2-A1。	

【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80μL，试剂一相应减少），则改变后的V1需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.0286x - 0.0052$ ：x 为标准品(nmoL)，y 为ΔA。



2、按样本鲜重计算：

单位定义：在 37℃，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)=[(ΔA+0.0052)÷0.0286]÷(W×V1÷V)÷T=29.14×(ΔA+0.0052)÷W

3、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：在 37℃，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)=[(ΔA+0.0052)÷0.0286]÷(V1×Cpr)÷T=29.14×(ΔA+0.0052)÷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)=[(ΔA+0.0052)÷0.0286]÷(500×V1÷V)÷T=0.059×(ΔA+0.0052)

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)=[(ΔA+0.0052)÷0.0286]÷V1÷T=29.14×(ΔA+0.0052)

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 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，标准品母液浓度为 $50\mu\text{mol/mL}$ 。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如： $0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5\mu\text{mol/mL}$ 。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：

1. 吸取标准品母液 $100\mu\text{L}$ ，加入 $900\mu\text{L}$ 蒸馏水，混匀得到 $5\mu\text{mol/mL}$ 的标品稀释液；						
2. 吸取 $5\mu\text{mol/mL}$ 的标品稀释液 $100\mu\text{L}$ ，加入 $900\mu\text{L}$ 蒸馏水，混匀得到 $0.5\mu\text{mol/mL}$ 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{mol/mL}$	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
标品稀释液 μL	0	40	80	120	160	200
水 μL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据加样表操作，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 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	40	
蒸馏水		40
试剂一	160	160
混匀后于 405nm 处读取 A 值， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		