



苯胺-4 羟化酶(AH)活性检测试剂盒

中文名称：[苯胺-4 羟化酶\(AH\)活性检测试剂盒](#)

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

产品包装：盒装

产品规格：100 管/48 样

别名：苯胺-4 羟化酶试剂盒 AH Kit 苯胺-4 羟化酶(AH)试剂盒 苯胺-4 羟化酶(AH)测试盒

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℃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-吲哚复合物，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(可适当调整待测样本量)**

- 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°C离心 30min, 取上清液, 转移到超速离心管中。

2、粗制微粒体: 4°C, 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。

AH 活性(nmol/min/mg prot) = $C_{\text{标}} \times V_{\text{标}} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div A_{\text{标准管}} \times F \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 2 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div A_{\text{标准管}} \div C_{\text{pr}}$

(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。

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

C 标: 10 μ mol/L; V 标: 100 μ L=0.1mL; F: 稀释倍数, $V_{\text{反总}} \div V_{\text{上清液}} = 300\mu\text{L} \div 100\mu\text{L} = 3$; 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 μ 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。

