

氨基比林-N-脱甲基酶（AND）试剂盒说明书

分光光度法 100 管/48 样

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。

自备仪器和用品：

可见分光光度计、普通离心机，超速离心机、水浴锅、可调式移液枪、1mL 玻璃比色皿、蒸馏水、无水乙醇和冰。

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 活性测定操作：

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 500μL 上清液，500μL 试剂七，混匀后 60℃

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。

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

(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。

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

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: $V \text{ 反总} \div V \text{ 上清液} = (50+850+50+50+175+175) \div 500=2.7$; 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。