

# 芳基酰胺酶活性测定试剂盒说明书

(微板法 96 样)

## 一、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。

## 二、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°C保存	
试剂二	液体 4mL×1 支	4°C保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4°C保存	若要重新做标曲则用到该试剂。

## 三、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。

## 四、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°C×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°C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<sup>4</sup>)：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°C)。

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：

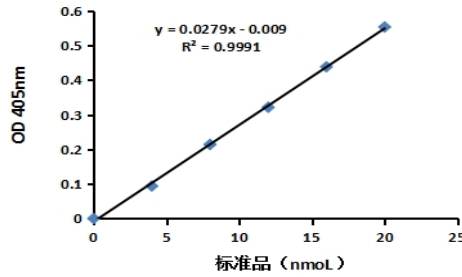
试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	120
样本	40
试剂二	40
混匀，立即于 405nm 处读取 A1 值，37°C 反应 30min 后读取 A2 值。ΔA=A2-A1。	

【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： $y = 0.0279x - 0.009$ ；x 为标准品(nmoL)，y 为  $\Delta A$ 。



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°C，每 10<sup>4</sup> 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/10<sup>4</sup> 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°C，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，万；

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（50 $\mu$ mol/mL）：临用前甩几下或离心，使粉体落入底部，加入 0.5mL 乙醇，涡旋震荡溶解后再加入 0.5mL 的蒸馏水混匀，得到 50 $\mu$ mol/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, 0.5 $\mu$ mol/mL。也可根据实际来调整浓度。
- 3 40 $\mu$ L 标准品+160 $\mu$ L 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。