# 芳基酰胺酶活性测定试剂盒说明书

（货号：G0433F 分光法 48 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、 测试盒组成和配制：

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|---|---|---|---|
| 试剂一 | 液体 30mL×1 瓶 | 4℃保存 | |
| 试剂二 | 液体 8mL×1 支 | 4℃保存 | |
| 标准品 | 粉体 mg×1 支 | 4℃保存 | 若要重新做标曲则用到该试剂。 |

## 三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL玻璃比色皿（光径1cm）、水浴锅、台式离心机、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（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 10min，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℃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（$10^4$）：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 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 405nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。

③ 在 1mL 玻璃比色皿中依次加入：

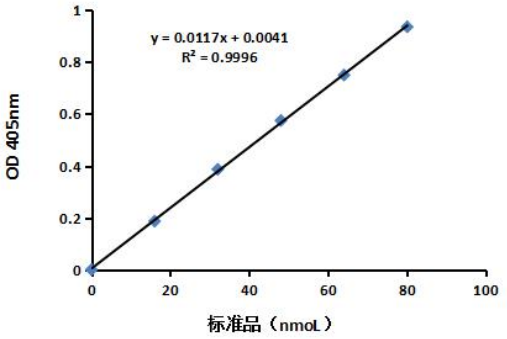
| 试剂名称（μL） | 测定管 |
|---|---|
| 试剂一 | 480 |
| 样本 | 160 |
| 试剂二 | 160 |
| 混匀，**立即**于 405nm 处读取 A1 值，37℃反应 30min 后读取 A2 值。ΔA=A2-A1。 | |

**【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320μL，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 = 0.0117x + 0.0041：x 为标准品(nmoL)，y 为ΔA。




2、按样本鲜重计算：

酶活定义：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-0.0041)÷0.0117]÷(W×V1÷V)÷T

=17.806×(ΔA-0.0041)÷W

3、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：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-0.0041)÷0.0117]÷(V1×Cpr)÷T

=17.806×(ΔA-0.0041)÷Cpr

4、按细胞数量计算：

酶活定义：在 37℃，每 $10^4$ 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/$10^4$ cell)= [(ΔA-0.0041)÷0.0117]÷(500×V1÷V)÷T=0.0356×(ΔA-0.0041)

5、按照液体体积计算：

酶活定义：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-0.0041)÷0.0117]÷V1÷T=17.806×(ΔA-0.0041)

V---加入提取液体积，1 mL； V1---加入样本体积，0.16mL；

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 制备标准品母液（10μmol/mL）：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，得到 10μmol/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, 0.5μmol/mL。也可根据实际来调整浓度。

3 160μL 标准品+640μL 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。