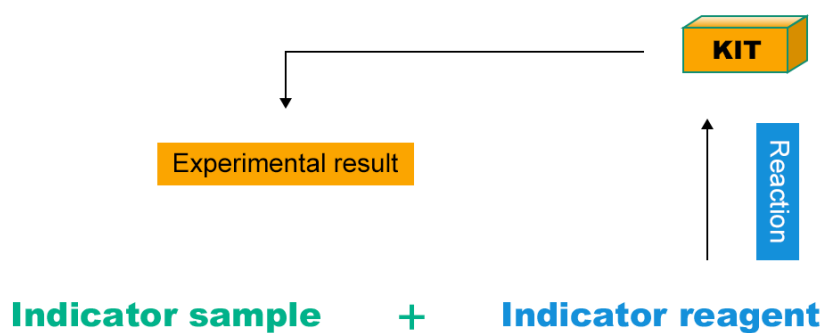


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0991

Size: 100T/96S

碳酸酐酶 (CA) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

碳酸酐酶 (Carbonic Anhydrase, CA) 是一种含锌金属酶, 迄今在哺乳动物体内已发现至少有 11 种同工酶, 它们的结构、分布、性质各异, 多与各种上皮细胞分泌 H⁺ 和碳酸氢盐有关, 通过催化 CO₂ 水化反应及某些脂、醛类水化反应, 参与多种离子交换, 维持机体内环境稳态。

二、测定原理:

碳酸酐酶具有酯酶活性, 可催化乙酸对硝基苯酯反应生成对硝基苯酚, 通过检测 405nm 处吸光值上升速率反映碳酸酐酶活性。

三、需自备的仪器和用品:

酶标仪、水浴锅、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100mL × 1 瓶	4℃ 保存	—
试剂一	液体 20mL × 1 瓶	4℃ 保存	—
试剂二	粉剂 × 1 瓶	-20℃ 避光保存	临用前加入 5mL 试剂三, 充分溶解待用, 用不完的试剂继续 -20℃ 避光保存。
试剂三	液体 6mL × 1 瓶	4℃ 保存	—

五、样品测定的准备:

- 1、细菌或细胞的处理: 收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000:1 的比例 (建议 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 20% 或 200W, 超声 3S, 间隔 10S, 重复 30 次); 8000g, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 2、组织的处理: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液), 冰浴中匀浆。 8000g, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

六、测定步骤

- 1、酶标仪预热 30min, 调节波长至 405nm。
- 2、试剂一、试剂二提前 25℃预热 10min。
- 3、取 96 孔板, 依次加入 20 μ L 样本上清, 140 μ L 试剂一, 最后加入 40 μ L 试剂二。立刻混匀, 测定 405nm 下 3min 处吸光值 A1 与 6min 处吸光值 A2, $\Delta A = A2 - A1$

七、CA 活力计算:

标准条件下测定回归方程为 $y = 1.0424x + 0.001$, $R^2 = 0.9994$; x 为标准品浓度 (μ mol/mL), y 为吸光值。

1、按照蛋白浓度计算

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1nmol 对硝基酚定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{CA 活性 (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A - 0.001) \div 1.0424 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 1000 \\ &= 319.77 \times (\Delta A - 0.001) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

2、按样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织每分钟催化产生 1nmol 对硝基酚定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{CA 活性 (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A - 0.001) \div 1.0424 \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \\ &= 319.77 \times (\Delta A - 0.001) \div W \end{aligned}$$

3、按细菌或细胞密度计算

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1nmol 对硝基酚定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{CA 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A - 0.001) \div 1.0424 \times V_{\text{样}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \\ &= 0.639 \times (\Delta A - 0.001) \end{aligned}$$

$V_{\text{样}}$: 加入样本体积: 0.02mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万; T : 反应时间, 3min; 1000, μ mol 到 nmol 的换算系数。