

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-S0992

Size: 50T/48S

碳酸酐酶 (CA) 检测试剂盒说明书

分光光度法

*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:

分光光度计、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、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 60mL × 1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 40mL × 1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 × 1 瓶	-20℃ 避光保存	临用前加入 12mL 试剂三, 充分溶解待用, 用不完的试剂继续 -20℃ 避光保存。(注意: 试剂二为微量粉剂可能肉眼看不见, 正常溶解即可)
试剂三	液体 15mL × 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、分光光度计预热 30min, 调节波长至 405nm, 蒸馏水调零。

2、试剂一、试剂二提前 25℃预热 10min。

3、取 1mL 玻璃比色皿, 依次加入 100 μ L 样本上清, 700 μ L 试剂一, 最后加入 200 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 $y = 2.0848x + 0.001$, $R^2 = 0.9994$; 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。

$$\begin{aligned} \text{CA 活性 (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A - 0.001) \div 2.0848 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 1000 \\ &= 159.89 \times (\Delta A - 0.001) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned}\text{CA 活性 (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A - 0.001) \div 2.0848 \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \\ &= 159.89 \times (\Delta A - 0.001) \div W\end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned}\text{CA 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A - 0.001) \div 2.0848 \times V_{\text{样}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times \\ &1000 = 0.319 \times (\Delta A - 0.001)\end{aligned}$$

V 样：加入样本体积：0.1mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；Cpr：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，μmol 到 nmol 的换算系数。