

## 碳酸酐酶活性检测试剂盒（可见分光光度法）

产品货号：BA2201

产品规格：50T/48S

### 产品简介：

碳酸酐酶(Carbonic Anhydrase,CA,EC4.2.1.1)是一种以 $Zn^{2+}$ 为活性中心的金属酶，可用来高效催化 $CO_2$ 的可逆水合反应： $CO_2+H_2O\leftrightarrow HCO_3^-+H^+$ ，催化速率可达自然条件下的 $10^7$ 倍，是目前已知催化速率最快的酶之一。

碳酸酐酶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。



注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

### 产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体60mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体50mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×2瓶	2-8℃
标准品	液体1mL×1支	2-8℃

### 溶液的配制：

- 试剂二：试剂放于试剂瓶内玻璃瓶中。临用前取一支试剂二，加入320 $\mu$ L丙酮充分震荡溶解，-20℃可以分装保存1周，避免反复冻融。
- 试剂二工作液：临用前按试剂二：蒸馏水=40 $\mu$ L:960 $\mu$ L(5T)的比例进行混合配制成试剂二工作液，现用现配，用多少配多少。
- 标准品：5 $\mu$ mol/mL酚标准液。临用前取100 $\mu$ L的5 $\mu$ mol/mL 酚标准液于EP管中，加入1500 $\mu$ L蒸馏水充分混合，配制成0.3125 $\mu$ mol/mL的酚标准液。

### 需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、水浴锅/恒温培养箱、分析天平、台式离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、蒸馏水和冰。

### 操作步骤：

#### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

- 组织：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)，进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 细菌或培养细胞：先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 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次)，8000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 液体：直接测定。(若溶液呈现浑浊，则离心取上清后再测定)。

#### 二、测定步骤

- 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 405nm，蒸馏水调零。
- 标准管测定



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

- (1) 标准管的测定：在比色皿中加入 100 $\mu$ L 标准液，900 $\mu$ L 试剂一，充分混匀后于 405nm 处测定吸光值，记作 A<sub>标准</sub>。
  - (2) 标准空白管的测定：在比色皿中加入 100 $\mu$ L 蒸馏水，900 $\mu$ L 试剂一，充分混匀后于 405nm 处测定吸光值，记作 A<sub>标准空白</sub>。
  - (3) 计算  $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{标准空白}$ 。(标准管和标准空白管只需做 1-2 次。)
3. 操作表：(在 1mL 玻璃比色皿中加入)

试剂名称 ( $\mu$ L)	测定管	空白管
样本	100	-
提取液	-	100
试剂一	700	700
试剂二工作液	200	200

按照加样表依次在 1mL 玻璃比色皿加入上述试剂，充分混匀后于 405nm 处测定 10s 时的吸光值 A<sub>1</sub>，迅速置于 37 $^{\circ}$ C 水浴或恒温培养箱中反应 5min，拿出迅速擦干测定 5min10s 时的吸光值 A<sub>2</sub>。计算  $A_{测定} = A_2 - A_1$ ， $A_{空白} = A_2_{空白} - A_1_{空白}$ ， $\Delta A = A_{测定} - A_{空白}$ 。(空白管只需做 1-2 次。)

### 三、CA 活性计算

- (1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：37 $^{\circ}$ C，每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1 $\mu$ mol 对硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$CA \text{ 活性(U/mg prot)} = C_{标} \times \Delta A \div \Delta A_{标准} \times V_{样} \div (V_{样} \times C_{pr}) \div T \times F = 0.0625 \times \Delta A \div \Delta A_{标准} \div C_{pr} \times F$$

- (2) 按样本质量计算

单位的定义：37 $^{\circ}$ C，每 g 组织每分钟催化产生 1 $\mu$ mol 对硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$CA \text{ 活性(U/g 质量)} = C_{标} \times \Delta A \div \Delta A_{标准} \times V_{样} \div (V_{样} \div V_{样总} \times W) \div T \times F = 0.0625 \times \Delta A \div \Delta A_{标准} \div W \times F$$

- (3) 按液体体积计算

单位的定义：每 mL 液体每分钟催化产生 1 $\mu$ mol 对硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$CA \text{ 活性(U/mL)} = C_{标} \times \Delta A \div \Delta A_{标准} \times V_{样} \div V_{样} \div T \times F = 0.0625 \times \Delta A \div \Delta A_{标准} \times F$$

- (4) 按细菌/细胞数量计算

单位的定义：37 $^{\circ}$ C，每万个细菌/细胞每分钟催化产生 1 $\mu$ mol 对硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$CA \text{ 活性(U/10}^4 \text{ cell)} = C_{标} \times \Delta A \div \Delta A_{标准} \times V_{样} \div (V_{样} \div V_{样总} \times N) \div T \times F = 0.0625 \times \Delta A \div \Delta A_{标准} \div N \times F$$

C<sub>标</sub>：标准品浓度，0.3125 $\mu$ mol/mL；V<sub>样</sub>：反应体系中加入的样本体积，0.1mL；V<sub>样总</sub>：加入的提取液体积，1mL；T：反应时间，5min；C<sub>pr</sub>：蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细菌/细胞数量，以万计；F：样本稀释倍数。

### 注意事项：

如果 A<sub>1</sub> 测定大于 0.5 或者  $\Delta A$  大于 1，可以用蒸馏水对样本进行稀释或者缩短 37 $^{\circ}$ C 酶促反应时间； $\Delta A$  小于 0.02，可以加大样本量或者延长 37 $^{\circ}$ C 酶促反应时间。注意计算时同步修改计算公式。



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物科技有限公司**

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com