



碳酸酐酶活性检测试剂盒

Carbonic Anhydrase Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



碳酸酐酶活性检测试剂盒

Carbonic Anhydrase Activity Assay Kit

一、产品描述

碳酸酐酶是一种含锌金属酶，广泛分布于人体内的肾小管上皮细胞、胃黏膜、胰腺和红细胞等组织以及植物叶片中，可催化 CO_2 水化反应及某些脂、醛类水合反应，参与多种离子交换和维持机体内环境稳态，并在体液 pH 调节以及植物光合作用等方面具有重要作用。

碳酸酐酶能够催化乙酸对硝基苯酯反应生成对硝基苯酚，产物在 405 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可表征碳酸酐酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 120 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	粉剂×2 支	-20°C 避光保存	使用前每支加入 200 μL 丙酮充分溶解 (分装后 -20°C 可保存 1 周，避免反复冻融)
标准液	液体 1 mL×1 支	4°C 避光保存	10 $\mu\text{mol/mL}$ 对硝基苯酚标准液
标准稀释液的制备（现配现用）：使用前将 10 $\mu\text{mol/mL}$ 对硝基苯酚标准液使用蒸馏水稀释至 1.2、1.0、0.8、0.4、0.2、0.1 $\mu\text{mol/mL}$ 即为标准稀释液。			

需自备试剂：丙酮（ CH_3COCH_3 ，MW=58.08，CAS:67-64-1）

序号	1	2	3	4	5	6
稀释前浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	10	10	10	0.8	0.4	0.2
标准液体积 (μL)	60	50	40	200	200	200
蒸馏水体积 (μL)	440	450	460	200	200	200
稀释后浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	1.2	1.0	0.8	0.4	0.2	0.1

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：酶标仪、96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱、丙酮和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 10000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，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 1 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次），4℃ 10000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

③血清（浆）、培养液等液体样本：直接检测或适当稀释后再进行检测。

2.测定步骤

①酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 405 nm。

②检测工作液的制备（现用现配）：使用前根据使用量按试剂二：蒸馏水=1:24 体积比配制。

③标准稀释液的测定：在 96 孔板中依次加入下列试剂

试剂	标准组 (μ L)	空白组 (μ L)
标准稀释液	20	-
蒸馏水	-	20
试剂一	180	180

吸光值测定：测定 405 nm 处吸光值，记为 A 标准和 A 空白；计算 $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。注：各浓度标准组和空白组只需测定 1-2 次。

标准曲线的建立：以 1.2、1.0、0.8、0.4、0.2、0.1 μ mol/mL 标准稀释液浓度为横坐标（x），以其对应的 $\Delta A_{\text{标准}}$ 为纵坐标（y），绘制标准曲线，得到线性回归方程 $y=kx+b$ 。

④碳酸酐酶活性测定：在 96 孔板中依次加入下列试剂

试剂	测定组 (μ L)	对照组 (μ L)
粗酶液	20	-
提取液	-	20
试剂一	140	140
检测工作液	40	40

吸光值测定：①立即充分混合并开始计时，测定 10 s（总时间）时 405 nm 处吸光值，记为 A1 测定和 A1 对照；②37℃恒温准确反应 300 s，测定 310 s（总时间）时 405 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 对照；③计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A2_{\text{测定}} - A1_{\text{测定}}$ ， $\Delta A_{\text{对照}} = A2_{\text{对照}} - A1_{\text{对照}}$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{对照}}$ 。将 ΔA 带入标准曲线方程 $y=kx+b$ ，计算样品浓度 x（ μ mol/mL）注：对照组只需测定 1-2 次。

3.碳酸酐酶（CA）活性计算

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 μmol 对硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$CA \text{ (U/mg prot)} = \frac{x \times D}{C_{pr} \times T} = \frac{0.2 \times x \times D}{C_{pr}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟生成 1 μmol 对硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$CA \text{ (U/g)} = \frac{x \times V_{\text{样总}} \times D}{W \times T} = \frac{0.2 \times x \times D}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10⁴ 个细菌或细胞每分钟生成 1 μmol 对硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$CA \text{ (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{x \times V_{\text{样总}} \times D}{\text{细菌或细胞数量} \times T} = \frac{0.2 \times x \times D}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟生成 1 μmol 对硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$CA \text{ (U/mL)} = \frac{x \times D}{T} = 0.2 \times x \times D$$

注释： V 样总：粗酶液总体积，1 mL；C_{pr}：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计，若 500 万细菌或细胞代入 500 即可；T：酶促反应时间，5 min；D：粗酶液稀释倍数，若未稀释则为 1。

四、注意事项

①准确在规定时间点完成吸光值测定，以确保检测结果的准确性和重复性；若样本较多时应使用多道移液器且分批完成检测，以确保组内反应时间一致；

②若 ΔA 大于 1.0 或 A₁ 测定大于 0.5，建议将粗酶液适当用**提取液**稀释后再进行测定；若 ΔA 小于 0.02，建议适当延长酶促反应时间（37℃反应时间）或增加样本量后再进行测定，计算时相应修改；

③试剂二配制后有效期短，为便于试验安排，附赠一瓶试剂二作为备用，每瓶均可完成至少 100 个样本的检测用量；

④为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

