

## 碳酸酐酶（CA）活性测定试剂盒说明书

（货号：G0614W 微板法 96 样）

### 一、产品简介：

碳酸酐酶（Carbonic Anhydrase, CA, EC 4.2.1.1）是一种含锌的金属酶，碳酸酐酶的结构多样，但都含有一个活性中心，其中锌离子（ $Zn^{2+}$ ）是其发挥催化作用的关键。

本试剂盒采用碳酸酐酶与乙酸对硝基苯酯反应，生成对硝基苯酚（PNP），在 405nm 处有最大吸光值，通过上升速率反映碳酸酐酶的活性。

### 二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶		
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉体 mg×5 支	4°C保存	临用前甩几下或离心使粉体落入底部，每支分别加 1.1mL 无水乙醇混匀溶解，混匀后可-20°C分装保存（尽量避免反复冻融），三天内用完。
标准品	粉体 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

### 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、低温离心机、恒温培养箱、可调式移液器、研钵、水浴锅、蒸馏水、无水乙醇。

### 四、碳酸酐酶（CA）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品和实验流程，避免样本和试剂浪费！

#### 1、样本制备：

① 组织样本：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°C×12000rpm 离心 10min，取上清液待测。

【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°C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

③ 液体样本：可直接测定，或者适当稀释后测定。若浑浊，离心后取上清检测。

#### 2、上机检测：

① 酶标仪预热 30 min，调节波长为 405nm。

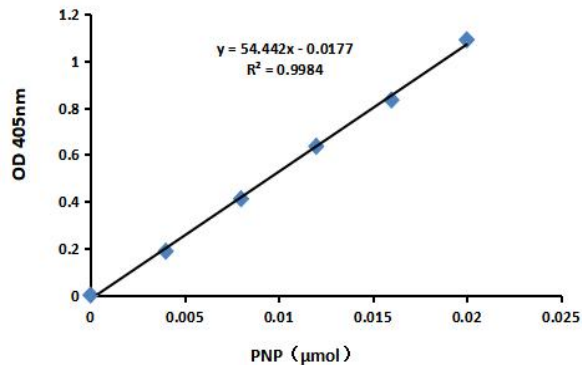
② 试剂一可提前于 37°C 水浴锅中孵育 15-30min。

③ 在 96 孔板中依次加入下列试剂：

试剂名称（ $\mu$ L）	测定管
样本	20
试剂一	140
试剂二	40
混匀，10s 后于 405nm 处读取吸光值 A1，再于 37°C 孵育 5min（精确）后，立即读取吸光值 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

## 五、结果计算：

1、标准曲线：  $y = 54.442x - 0.0177$ ， x 是 PNP 摩尔质量：  $\mu\text{mol}$ ； y 是  $\Delta A$ 。



2、按照样本质量计算：

酶活定义：在  $37^{\circ}\text{C}$  下，每克组织每分钟催化底物产生  $1\mu\text{mol}$  的 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\text{CA} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g} \text{ 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0177) \div 54.442] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 0.184 \times (\Delta A + 0.0177) \div W \times D$$

3、按照样本蛋白浓度计算：

酶活定义：在  $37^{\circ}\text{C}$  下，每毫克蛋白每分钟催化底物产生  $1\mu\text{mol}$  的 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\text{CA} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg} \text{ prot}) = [(\Delta A + 0.0177) \div 54.442] \div (Cpr \times V1) \div T \times D = 0.184 \times (\Delta A + 0.0177) \div Cpr \times D$$

4、按细菌/细胞数量计算：

酶活定义：在  $37^{\circ}\text{C}$  下，每  $10^4$  个细胞每分钟催化底物产生  $1\text{nmol}$  的 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{CA} (\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0177) \div 54.442] \times 10^3 \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 0.367 \times (\Delta A + 0.0177) \times D \end{aligned}$$

5、按液体体积计算：

酶活定义：在  $37^{\circ}\text{C}$  下，每毫升液体每分钟催化底物产生  $1\mu\text{mol}$  的 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\text{CA 活力} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0177) \div 54.442] \div V1 \div T = 0.184 \times (\Delta A + 0.0177)$$

W---样品质量，g；

V---提取液体积，1 mL；

V1---上清液体积 (mL)，0.02mL；

T---反应时间，5min。

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

500---细胞数量，万；

Cpr---上清液蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 ( $10\mu\text{mol}/\text{mL}$ )：向标准品 EP 管里面加入 1.4mL 无水乙醇超声溶解，若有结晶析出，需  $37^{\circ}\text{C}$  水浴至完全溶解。
- 2 把母液用无水乙醇稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8,  $1\mu\text{mol}/\text{ml}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照  $20\mu\text{L}$  的各个浓度标准品 +  $140\mu\text{L}$  试剂一 +  $40\mu\text{L}$  蒸馏水，混匀 5min 后于 405nm 处立即读值，根据结果即可制作标准曲线。