



碳酸酐酶活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: BC5440

规格: 50T/48S

产品内容: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

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

溶液的配制:

- 1、试剂二: 临用前取一支试剂二, 加入 320 μ L 丙酮充分震荡溶解, -20℃可以分装保存 1 周, 避免反复冻融。
- 2、试剂二工作液: 临用前按试剂二: 蒸馏水=40 μ L: 960 μ 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。
- 3、标准品: 5 μ mol/mL 酚标准液。临用前取 100 μ L 的 5 μ mol/mL 酚标准液于 EP 管中, 加入 1500 μ L 蒸馏水充分混合, 配制成 0.3125 μ mol/mL 的酚标准液。

产品说明:

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: $CO_2+H_2O\rightleftharpoons HCO_3^-+H^+$, 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。



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)

- 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。
- 2、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。
- 3、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

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

- (1) 标准管的测定：在比色皿中加入100 μ L标准液，900 μ L试剂一，充分混匀后于405nm处测定吸光值，记作A_{标准}。
- (2) 标准空白管的测定：在比色皿中加入100 μ L蒸馏水，900 μ L试剂一，充分混匀后于405nm处测定吸光值，记作A_{标准空白}。
- (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 (μ 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，立即充分混匀后于 405nm 处测定 10s 时的吸光值 A₁，迅速置于 37 $^{\circ}$ C水浴锅或者恒温培养箱中反应 5min，拿出迅速擦干测定 5min10s 时的吸光值 A₂。计算 $A_{测定}=A_{2测定}-A_{1测定}$ ， $A_{空白}=A_{2空白}-A_{1空白}$ ， $\Delta A=A_{测定}-A_{空白}$ 。（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 μ 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 μ 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 μ mol 对硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

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

C_标：标准品浓度，0.3125 μ mol/mL；V_样：反应体系中加入的样本体积，0.1mL；V_{样总}：加入的提取液体积，1mL；T：反应时间，5min；C_{pr}：蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；F：样本稀释倍数。

注意事项：

如果 A₁ 测定大于 0.5 或者 ΔA 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； ΔA 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。

实验实例：

1、称取 0.1029g 小鼠肝脏组织，加入提取液进行冰浴匀浆，离心后取上清，将上清稀释 160 倍后，按照测定步骤操作，用 1mL 玻璃比色皿测得计算 $A_{测定}=A_{2测定}-A_{1测定}=0.599-0.169=0.43$ ， $A_{空白}=A_{2空白}-A_{1空白}=0.266-0.13=0.136$ ， $\Delta A=A_{测定}-A_{空白}=0.294$ ， $\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{标准空白}=0.434-0.003=0.431$ ，带入公式计算：

$$CA\text{活性 (U/g 质量)} = 0.0625 \times \Delta A \div \Delta A_{标准} \div W \times F = 66.29 \text{ U/g 质量}$$

2、称取 0.1058g 娃娃菜叶片组织，加入提取液进行冰浴匀浆，离心后取上清，将上清稀释 4 倍后，按照测定步骤操作，用 1mL 玻璃比色皿测得计算 $A_{测定}=A_{2测定}-A_{1测定}=0.424-0.158=0.266$ ， $A_{空白}=A_{2空白}-A_{1空白}=0.266-0.13=0.136$ ， $\Delta A=A_{测定}-A_{空白}=0.13$ ， $\Delta A_{标准}=A_{标准}-A_{标准空白}=0.434-0.003=0.431$ ，带入公式计算：

$$CA\text{活性 (U/g 质量)} = 0.0625 \times \Delta A \div \Delta A_{标准} \div W \times F = 0.713 \text{ U/g 质量}$$

3、吸取 100 μ L 兔血清，将血清用蒸馏水稀释 8 倍后，按照测定步骤操作，用 1mL 玻璃比色皿测得计算 $A_{\text{测定}}=A_{2\text{测定}}-A_{1\text{测定}}=0.739-0.197=0.542$ ， $A_{\text{空白}}=A_{2\text{空白}}-A_{1\text{空白}}=0.266-0.13=0.136$ ， $\Delta A=A_{\text{测定}}-A_{\text{空白}}=0.406$ ， $\Delta A_{\text{标准}}=A_{\text{标准}}-A_{\text{标准空白}}=0.434-0.003=0.431$ ，带入公式计算：

$$\text{CA活性 (U/mL)} = 0.0625 \times \Delta A \div \Delta A_{\text{标准}} \times F = 0.471 \text{ U/mL}$$

参考文献：

[1] BROWNELL, P. F, BIELIG, et al. Increased Carbonic Anhydrase Activity in Leaves of Sodium-Deficient C4 Plants[J]. Functional Plant Biology, 1991, 18(6):589-592.

[2] A, V. Tavallali , et al. Zinc influence and salt stress on photosynthesis, water relations, and carbonic anhydrase activity in pistachio. Scientia Horticulturae, 2009, 123(2): 272-279.

相关系列产品：

BC0440/BC0445 二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶（Rubisco）活性检测试剂盒

BC3310/BC3315 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶（PEPCK）活性检测试剂盒

