

Carbonic Anhydrase Activity Assay Kit

碳酸酐酶（CA）活性测定试剂盒说明书

货号: BN72466 | 方法: 微板法 | 规格: 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:

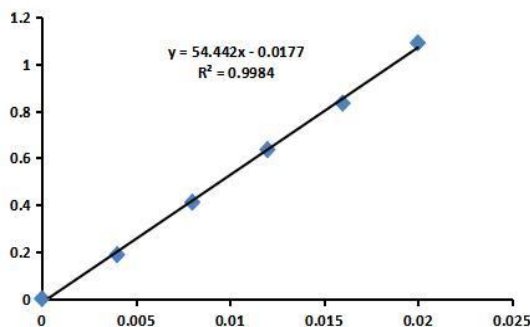
试剂名称（ μ L）	测定管
样本	20
试剂一	140
试剂二	40
混匀，10s 后于 405nm 处读取吸光值	

A1, 再于 37°C 孵育 5min (精确) 后,
立即读取吸光值 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。

注意: 本操作流程适用于绝大多数常规样本检测, 实验条件可根据实际样本状态适度微调;
针对特殊类型样本, 我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 54.442x - 0.0177$, x 是 PNP 摩尔质量: μmol ; y 是 ΔA 。



标准曲线示意图

说明: 标准曲线由标准品测定获得, 具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

2、按照样本质量计算:

酶活定义: 在 37°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。

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

3、按照样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 在 37°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。

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

4、按细菌/细胞数量计算:

酶活定义: 在 37°C 下, 每 10^4 个细胞每分钟催化底物产生 1nmol 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°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。