

肌酐酶 (CAH)

rp216173

储存温度 -20℃ 储存

用途

水解肌酐，用于酶法肌酐试剂的研发和大量配制。

酶学性质

来源:	微生物	
酶学委员会编号:	EC 3.5.2.10	
分子量:	29 kDa (SDS-PAGE)	
等电点:	5.3	
Km 值:	5.0×10 ⁻² M (Creatinine), 8.0×10 ⁻² M (Creatine)	
抑制剂:	Hg ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ³⁺	
最适 pH:	7.0-8.0	图 1
最适温度:	65℃	图 2
pH 稳定性:	pH 5.5-10.0 (25℃, 16 h)	图 3
热稳定性:	65℃以下稳定 (pH 8.0, 30 min)	图 4
稳定性:	-25 ~ -15℃ 静置保存 12 个月保持 90%以上活性	图 5
保护剂:	糖类以及 BSA	

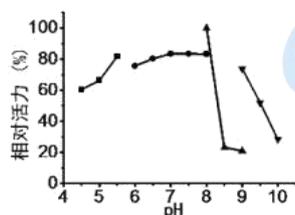


图 1 最适 pH

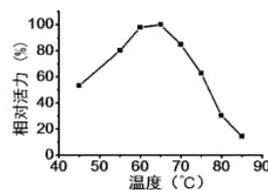


图 2 最适温度

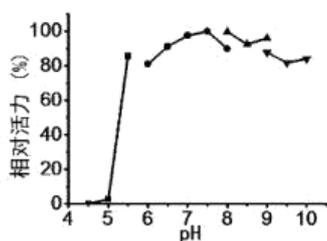


图3 pH 稳定性

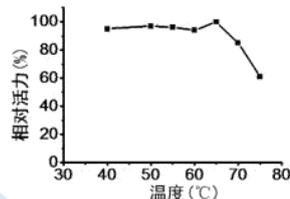


图4 热稳定性

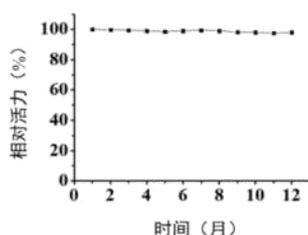
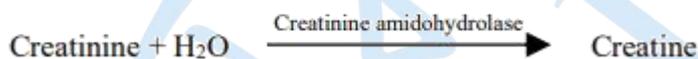


图5 稳定性 (-25~-15°C保存)

活性测定方法

1、原理

原理



2、酶活计算

单位酶活定义为在下述条件下，每分钟催化反应生成 1 μmol 肌酸所需的酶量。

3、试剂准备

试剂 I: 0.3 M 磷酸钾缓冲液, pH 6.5。

试剂 II: 0.1 M 肌酐溶液 (1.13 g 肌酐溶于 100mL UP 水中)。

试剂 III: 4% Na_2CO_3 溶液 (4.0 g Na_2CO_3 溶于 100mL UP 水中)。

试剂 IV: 2% α -萘酚溶液 (2.0 g α -萘酚溶于 100 mL 99.5%乙醇中)。

试剂 V: 1.2 g NaOH 和 3.2 g Na_2CO_3 溶于双蒸水中, 定容至 100 mL。

试剂 VI: 0.05%二乙酰溶液 (0.05 mL 二乙酰加水定容至 100 mL)。

酶稀释液: 5 mM Tris-HCl pH 8.0。

4、操作步骤

4.1. 在 5 mL 离心管中加入 0.1 mL 试剂 I, 0.8mL 试剂 II。

4.2. 37°C水浴 5 分钟。

4.3. 加入 0.1 mL 待测样品, 37°C孵育 10 分钟。

4.4. 加入 2.0 mL 试剂 III 终止反应, 取出置于冰上。

4.5. 在新的 5 mL 离心管中按顺序加入如下试剂:

第 4 步的溶液: 80 μL

双蒸水: 720 μL

试剂 IV: 400 μL

试剂 V: 400 μL

试剂 VI: 400 μL

4.6. 25°C 静置 1 h 后, 加入 2 mL 双蒸水稀释。

4.7. 用分光光度计在 525 nm 检测吸光度。

*用酶稀释液替代酶液, 其它步骤相同, 所得溶液吸光度为空白吸光度 (ΔA_b)

$\Delta A = \Delta A_s - \Delta A_b$

5、活力计算

$$\text{Volume activity (U/ml)} = \frac{\Delta A \times v_t \times d_f}{0.0704 \times t \times V_s \times 1.0} = \Delta A \times 14.2 \times t$$

$$\text{Weight activity (U/mg)} = \text{Volume activity} \times 1/C$$

V_t : 反应液总体积 (1.0mL)

V_s : 酶液体积 (0.1mL)

t : 反应时间 (10 分钟)

d_f : 稀释倍数

C : 酶浓度 (mg/mL)

1.0: 光路长度 (cm);

0.0704: 标准反应条件下, 生色基团在 525nm 处毫摩尔吸光系数 ($\text{cm}^2/\mu\text{mol}$)。