

NADPH-细胞色素 C 还原酶 (NCR) 活性检测试剂盒 (分光光度计法)
(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0469	NADPH-细胞色素 C 还原酶 (NCR) 活性检测试剂盒	50 管/48 样

产品内容

名称	规格	储存条件
试剂一	粉剂×1 瓶: 临用前加入 100mL 蒸馏水充分溶解。	4℃
试剂二	液体×1 瓶: 使用前在 37℃ 水浴中预热 30min。	4℃
试剂三	粉剂×1 瓶: 临用前加入 2.6mL 蒸馏水充分溶解, 4℃ 保存。	-20℃
试剂四	粉剂×1 瓶: 临用前加入 550μL 蒸馏水充分溶解, 4℃ 保存。	4℃

一、产品说明

细胞色素 P450 酶是一组主要存在于肝脏的同工酶, 在外源物质代谢中具有重要作用, 尤其是药物和毒物的代谢。NADPH-细胞色素 C 还原酶 (NCR) 作为 P450 酶系的重要一员, 催化氧化型 P450 还原再生。

NCR 催化 NADPH 还原氧化型细胞色素 C 生成还原型细胞色素 C, 还原型细胞色素 C 在 550nm 处有特征吸收峰; 通过测定 550nm 吸光度的增加速率, 来计算 NCR 活性。

二、自备材料

可见分光光度计、普通离心机、超速离心机、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、蒸馏水。

三、粗酶液提取

- 1、去除细胞核和线粒体等: 称取组织约 0.5g, 加入 4℃ 预冷的 1mL 试剂一, 冰上充分研磨, 10 000g 4℃ 离心 30min, 取上清, 转移到超速离心管中。
- 2、粗制微粒体: 100 000g 4℃ 离心 60min, 弃上清。
- 3、去除血红蛋白等杂质: 向步骤 2 的沉淀中加入 1mL 试剂一, 盖紧后充分震荡溶解, 100 000g 4℃ 离心 30min, 弃上清。
- 4、最终微粒体: 向步骤 3 的沉淀中加入 0.5mL 试剂二, 盖紧后充分震荡溶解, 4℃ 保存待测。

四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 550nm, 蒸馏水调零。
- 2、空白管: 取 1mL 玻璃比色皿, 依次加入 50μL 蒸馏水、900μL 试剂二、50μL 试剂三、10μL 试剂四, 迅速混匀后于 550nm 处测定 2min 内吸光值变化: 第 10s 和第 130s 的吸光值分别记为 A1 和 A2, ΔA 空白管 = A2 - A1。空白管只需做一次。
- 3、测定管: 取 1mL 玻璃比色皿, 依次加入 50μL 粗酶液、900μL 试剂二、50μL 试剂三、10μL 试剂四, 迅速混匀后于 550nm 处测定 2min 内吸光值变化: 第 10s 和第 130s 的吸光值分别记为 A3 和 A4, ΔA 测定管 = A4 - A3。

五、活性的计算

1、按照样本蛋白浓度计算:

单位定义: 37℃ 每 min 每 mg 蛋白催化产生 1nmol 还原型细胞色素 C 为一个 酶活单位。

$$\text{NCR 酶活 (nmol/min/mg prot)} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T$$
$$= 529 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}。$$

2、按照样本鲜重计算:

单位定义: 37℃ 每 min 每 g 组织催化产生 1nmol 还原型细胞色素 C 为一个 酶活单位。

$$\text{NCR 酶活 (nmol/min/g 鲜重)} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总})$$
$$\div T = 265 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W。$$

V 样本: 吸取样本体积, 0.02mL; V 试剂一: 吸取试剂一体积, 0.1mL; V 样总: 吸取提取液体积, 1mL; W: 样本鲜重, g; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; T: 反应时间, 0.5h; 500: 细胞数量或微生物数量, 500 万。

ϵ : 还原型细胞色素 C 摩尔消光系数, 19100L/mol/cm=0.0191L/ μ mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应体系总体积, 1010 μ L=0.00101L; Cpr: 上清液蛋白质浓度, mg/mL, 需要另外测定; V 样: 加入反应体系中上清液体积, 50 μ L=0.05mL; V 样总: 加入提取液(试剂二)体积, 0.5mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 2min。

六、注意事项

- 1、试剂三、试剂四如未全部使用, 剩余的可在 4℃ 保存 2 天。
- 2、空白管只需测一次。