

NADPH-细胞色素 C 还原酶 (NCR) 活性检测试剂盒 (微量法)
(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
YFX0470	NADPH-细胞色素 C 还原酶 (NCR) 活性检测试剂盒	100 管/96 样

产品内容

名称	规格	储存条件
试剂一	粉剂×2 瓶: 临用前每瓶加入 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 管: 临用前加入 1.04mL 蒸馏水充分溶解, 4℃ 保存。	-20℃
试剂四	粉剂×1 管: 临用前加入 1100μL 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

紫外分光光度计/酶标仪、普通离心机、超速离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、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/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 550nm, 蒸馏水调零。
- 2、空白管: 取微量石英比色皿/96 孔板, 依次加入 50μL 蒸馏水、180μL 试剂二、10μL 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: 取微量石英比色皿/96 孔板, 依次加入 50μL 粗酶液、180μL 试剂二、10μL 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

A. 使用 96 孔板测定的计算公式如下:

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。

$$\text{NCR 酶活 (nmol/min/mg prot)} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T = 1100 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}.$$

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。

$$\text{NCR 酶活 (nmol/min/g 鲜重)} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T = 550 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W.$$

ϵ : 还原型细胞色素 C 摩尔消光系数, $19100\text{L/mol/cm} = 0.0191\text{L}/\mu\text{mol/cm}$; d : 96 孔板光径 (cm), 0.5cm; V 反总: 反应体系总体积 (L), $210\mu\text{L} = 2.1 \times 10^{-4}\text{L}$; 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 (mL), $10\mu\text{L} = 0.01\text{mL}$; V 样总: 提取液体积, 0.5mL; T : 反应时间 (min), 2min。

B. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下:

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。

$$\text{NCR 酶活 (nmol/min/mg prot)} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T = 550 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}.$$

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。

$$\text{NCR 酶活 (nmol/min/g 鲜重)} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T = 275 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W.$$

ϵ : 还原型细胞色素 C 摩尔消光系数, $19100\text{L/mol/cm} = 0.0191\text{L}/\mu\text{mol/cm}$; d : 比色皿光径 (cm), 1cm; V 反总: 反应体系总体积 (L), $210\mu\text{L} = 2.1 \times 10^{-4}\text{L}$; 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 (mL), $10\mu\text{L} = 0.01\text{mL}$; V 样总: 提取液体积, 0.5mL; T : 反应时间 (min), 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。