

NADPH-细胞色素 C 还原酶 (NCR) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

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。NCR 作为 P450 酶系的重要一员, 催化氧化型 P450 还原再生。

测定原理:

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。

组成:

产品名称	CP001-50T/48S	Storage
试剂一: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂二: 液体	1 瓶	4°C
试剂三: 粉剂	1 瓶	-20°C
试剂四: 粉剂	1 瓶	4°C
说明书	一份	

试剂一: 粉剂×1 瓶, 4°C 保存。临用前加 100ml 蒸馏水充分溶解。

试剂三: 粉剂×1 瓶, -20°C 保存。临用前配制, 加 2.6 ml 蒸馏水充分溶解, 4°C 保存。

试剂四: 粉剂×1 瓶, 4°C 保存。临用前配制, 加 550 μl 蒸馏水充分溶解, 4°C 保存。

自备仪器和用品:

可见分光光度计、普通离心机, 超速离心机、可调式移液枪、1ml 玻璃比色皿和蒸馏水。

粗酶液提取:

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

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



测定操作:

1. 分光光度计预热 30 min, 调节波长到 550 nm, 蒸馏水调零。
2. 试剂二在 37°C 水浴中预热 30min。
3. 空白管: 取 1ml 玻璃比色皿, 依次加入 **50μl 蒸馏水**、900μl 试剂二、50μl 试剂三和 10μl 试剂四, 迅速混匀后于 550nm 处测定 2min 内吸光值变化, 第 10 s 和第 130 s 吸光值分别记为 A1 和 A2, ΔA 空白管 = A2-A1。
4. 测定管: 取 1ml 玻璃比色皿, 依次加入 **50μl 粗酶液**、900μl 试剂二、50μl 试剂三和 10μl 试剂四, 迅速混匀后于 550nm 处测定 2min 内吸光值变化, 第 10 s 和第 130 s 吸光值分别记为 A3 和 A4, ΔA 测定管 = A4-A3。

注意: 空白管只需要做一次。

计算公式:

(1).按照蛋白浓度计算

活性单位定义: 37°C 中, 每毫克蛋白每分钟催化产生 1nmol 还原型细胞色素 C 为 1 个酶活单位。

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

(2)按照样本质量计算

活性单位定义: 37°C 中, 每克样品每分钟催化产生 1nmol 还原型细胞色素 C 为 1 个酶活单位。

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

ϵ : 还原型细胞色素 C 摩尔消光系数, 19100L/mol/cm=0.0191L/μmol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 反总: 反应体系总体积, 1010μl=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, 50μl=0.05ml; V 样总: 加入提取液体积, 0.5ml; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 2min。

注意事项:

试剂三、试剂四临用前配制, 配好未使用完的 4°C 可保存两天。

