

红霉素-N-脱甲基酶 (Erythromycin N-demethylase, ERND) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 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酶系, 在外源物质代谢中, 尤其是药物和毒物的代谢, 具有重要作用。ERND 在 P450 酶系中相当于 CYP2B 亚型, 与药物代谢的去甲基化密切相关。CYP2B 具有催化底物形成非活性易于排泄的代谢产物而具有解毒作用, 也可使某些药物经 CYP2B 代谢活化。

测定原理:

ERND 催化红霉素释放甲醛, 通过 Nash 比色测定甲醛含量, 即可计算出 ERND 活性。

组成:

产品名称	CP007-50T/24S	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	4°C
试剂四: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂五: 液体	1 瓶	4°C
试剂六: 液体	1 瓶	4°C
试剂七: 液体	1 瓶	4°C
标准液: 液体	1 瓶	-20°C
说明书	一份	

试剂一: 粉剂×1 瓶, 4°C 保存。临用前加 50 ml 蒸馏水溶解。

试剂三: 粉剂×1 瓶, 4°C 保存。临用前加 2.6 ml 蒸馏水, 充分溶解。

试剂四: 粉剂×1 瓶, 4°C 保存。临用前加 2.6 ml 蒸馏水, 充分溶解。

试剂五: 粉剂×1 瓶, 4°C 保存。临用前, 加蒸馏水 9 ml 充分溶解。

标准液: 液体×1 瓶, -20°C 保存。临用前取 1.5 ml EP 管, 加入 10μl 标准液, 加 990μl 蒸馏水, 混匀即为 0.05 mmol/L 标准甲醛溶液, 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、蒸馏水和冰。

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



伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司

江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号



服务热线: 0518-81263339

官网:<http://www.bio149.com>

粗酶液提取：

- 1、除去细胞核，线粒体等大分子物质：称约 0.5g 组织，加入 1ml 试剂一，冰上充分研磨，**10 000g** 4°C 离心 30min，取上清液，转入超速离心管中。
- 2、粗制微粒体：**100 000g**，4°C，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 1ml 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 0.5ml，充分震荡溶解，即**粗酶液**，待测。该待测液需当天使用。

测定操作：

1. 分光光度计预热 30 min 以上，调节波长到 412 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂二置于 37°C 水浴中预热 30 min。
3. **对照管**：取 1 支 EP 管，加入 50μl 粗酶液，850μl 试剂二，50μl 试剂三，**50μl 蒸馏水**，混匀后置于 37°C 水浴保温 30min；立即加入 175μl 试剂五，混匀后置于冰浴中 5min；取出后加入 175μl 试剂六，混匀后室温静置 5min；室温 8000rpm 离心 5min；取新的 EP 管，加入 500μl 上清液，500μl 试剂七，混匀后 **60°C 水浴 10min**，然后取出，用冷水冷却 5min，于 412nm 测定光吸收，记为 A 对照管。
4. **测定管**：取 1 支 EP 管，加入 50μl 粗酶液，850μl 试剂二，50μl 试剂三，**50μl 试剂四**，混匀后置于 37°C 水浴保温 30min；立即加入 175μl 试剂五，混匀后置于冰浴中 5min；取出后加入 175μl 试剂六，混匀后室温静置 5min；室温 8000rpm 离心 5min；取 1 支新 EP 管，加入 500μl 上清液，500μl 试剂七，混匀后 **60°C 水浴 10min**，然后取出，用冷水冷却 5min，于 412nm 测定光吸收，记为 A 测定管。
5. **标准管**：取 1 支 EP 管，加入 500μl 标准品，500μl 试剂七，混匀后 **60°C 水浴 10min**，然后取出，用冷水冷却 5min，于 412nm 测定光吸收，记为 A 标准管。

注意：每个样品都需要做对照管。

ERND 活性计算公式：

(1) 按照蛋白浓度计算：

活性单位定义：37°C 下，每分钟每毫克蛋白催化产生 1nmol 甲醛为 1 个酶活单位。

$$\text{ERND 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = \frac{C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \times \text{稀释倍数} \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T}{= 45 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \div Cpr}$$

(2). 按照样本质量计算：

活性单位定义：37°C 下，每分钟每克样品催化产生 1nmol 甲醛为 1 个酶活单位。

$$\text{ERND 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = \frac{C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \times \text{稀释倍数} \div (W \times V \text{ 样}) \div T}{= 45 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \div W}$$

C 标准品：0.05 mmol/L=50μmol/L；V 标准品：500μl=0.0005 L；稀释倍数：V 反总÷V 上清液=(50+850+50+50+175+175) ÷500=2.7；Cpr：粗酶液蛋白质浓度，mg/ml，需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒；V 样：加入粗酶液体积，50μl=0.05ml；W：样本质量，g；T：催化反应时间，30min。

