

细胞色素 b5 (Cytochrome b5) 含量测定试剂盒说明书

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:

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。细胞色素 P450 和细胞色素 b5 是 P450 酶系的两个血红素蛋白, 其比值的变化与 P450 代谢活性密切相关。

测定原理:

氧化型细胞色素 b5 经连二亚硫酸钠还原后, 在 424nm 处有最大吸收峰, 通过测定 424nm 和 490nm 处吸光值的差异, 即可计算出细胞色素 b5 的含量。

组成:

产品名称	CP009-50T/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	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。

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。

工作液配制:

临用前配制, 戴一次性手套, 小心打开试剂三瓶盖, 加试剂二 50 ml 充分溶解, 4°C 避光可保存 1 周。

样品中细胞色素 b5 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。

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>

4、待测液：向步骤 3 的沉淀中加试剂二 0.5ml，盖紧后充分震荡溶解，即待测液，该待测液需当天测定。

细胞色素 b5 含量测定操作：

1. 分光光度计预热 30 min。
2. 工作液置于 25°C 水浴中预热 30 min。
3. 空白管：取 1ml 玻璃比色皿，加入 **50 μl 蒸馏水**，1000μl 工作液，室温静置 2 min，424nm 和 490nm 处吸光值，424nm 处吸光值记为 A 空白管 1，490nm 处吸光值记为 A 空白管 2。 ΔA 空白管 = A 空白管 1 - A 空白管 2
4. 测定管：取 1ml 玻璃比色皿，加入 **50 μl 待测液**，1000μl 工作液，室温静置 2 min，424nm 和 490nm 处吸光值，424nm 处吸光值记为 A 测定管 1，490nm 处吸光值记为 A 测定管 2。 ΔA 测定管 = A 测定管 1 - A 测定管 2。

注意：只需要做一个空白管。

样品细胞色素 b5 含量计算公式：

(1).按照蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{细胞色素 b5 含量(nmol/mg prot)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \\ &= 123 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2).按照样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{细胞色素 b5 含量 (nmol/g 鲜重)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \times (V \text{ 样总} \div V \text{ 样}) \div W \\ &= 61.4 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W \end{aligned}$$

ϵ ：还原型细胞色素 b5 纳摩尔消光系数， 171×10^{-6} L/nmol/cm；d：比色皿光径 (cm)，1cm；V 反总：反应体系总体积，1.05 mL=0.00105 L；Cpr：待测液蛋白质浓度 (mg/ml)，需要另外测定；V 样：加入反应体系中待测液体积，50 μl=0.05 ml；V 样总：待测液总体积，0.5 ml；W：样品质量，g。

