

细胞色素 b5 (Cytochrome b5) 含量测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

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。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	CP010-100T/96S	Storage
试剂一：粉剂	2 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×2 瓶，4°C 保存。临用前各加 100ml 蒸馏水，充分溶解。

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 20ml 充分溶解，4°C 避光可保存 1 周。

自备仪器和用品：

普通离心机，超速离心机、可调式移液枪、紫外分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、和蒸馏水。

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。

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/酶标仪预热 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 10 μ l 蒸馏水，200 μ l 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 10 μ l 待测液，200 μ l 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：

a.使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

$$\begin{aligned}\text{细胞色素 b5 含量(nmol/mg prot)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \\ &= 122.8 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

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

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，210 μ l = 2.1×10^{-4} 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，10 μ l = 0.01 ml; V 样总: 待测液总体积，0.5 ml; W: 样品质量 (g)。

b.使用 96 孔板测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

$$\begin{aligned}\text{细胞色素 b5 含量(nmol/mg prot)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \\ &= 245.6 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

$$\begin{aligned}\text{细胞色素 b5 含量 (nmol/g 鲜重)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times (V \text{ 样总} \div V \text{ 样}) \div W \\ &= 122.8 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W\end{aligned}$$

ϵ : 还原型细胞色素 b5 纳摩尔消光系数， 171×10^{-6} L/nmol/cm; d: 96 孔板光径 (cm)，0.5cm; V 反总: 反应体系总体积，210 μ l = 2.1×10^{-4} 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，10 μ l = 0.01 ml; V 样总: 待测液总体积，0.5 ml; W: 样品质量 (g)。

