



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

NADPH-细胞色素C还原酶活性检测试剂盒 (可见分光光度法)

货号: R42138

规格: 50T/48S

保质期: 6个月

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
试剂-A	粉剂×1瓶	4℃保存; 临用前根据用量每瓶加100mL蒸馏水充分溶解。
试剂-B	液体×1瓶	4℃保存;
试剂-C	粉剂×1管	-20℃保存; 临用前配制, 加2.6 mL蒸馏水充分溶解, 4℃保存。
试剂-D	粉剂×1管	4℃保存; 临用前配制, 加550μL蒸馏水充分溶解, 4℃保存。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

简介

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。NADPH-细胞色素 C 还原酶 (NADPH cytochrome c reductase, NCR) 作为 P450 酶系的重要一员, 催化氧化型 P450 还原再生。

原理: NCR 催化 NADPH 还原氧化型细胞色素 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。

自备用品:

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

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℃预冷的 1 mL试剂-A, 冰上充分研磨, 10 000g 4℃离心30min, 取上清液, 转移到超速离心管中。
2. 粗制微粒体: 4℃, 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-A, 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-B 0.5 mL, 盖紧后充分震荡溶解, 4℃保存待测。

测定步骤:

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-B 在 37℃水浴中预热 30min。
3. 取 1ml 石英比色皿依次加入下列试剂:

	空白管(μL)	测定管(μL)
蒸馏水	50	
试剂-B	900	
试剂-C	50	
试剂-D	10	
迅速混匀后于550nm处测定2min内吸光值变化, 第10s和第130s吸光值。 $\Delta A_{\text{空白管}} = A_2 - A_1$ 。		
提取液		50
试剂-B		900
试剂-C		50
试剂-D		10
迅速混匀后于550nm处测定2min内吸光值变化, 第10s和第130s吸光值。 $\Delta A_{\text{测定管}} = A_4 - A_3$ 。		

注意: 空白管只需做一次。

NCR 活性计算公式:

1. 按蛋白浓度计算

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

$$\text{NCR (nmol/min /mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 529 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本鲜重计算

活性单位定义: 37℃中, 每克组织每分钟催化产生 1μmol 还原型细胞色素 C 为 1 个酶活单位。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

$$\text{NCR (nmol/min/g 鲜重)} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T = 625 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

注: 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, 1cm ; V 反总: 反应体系总体积, $1010\mu\text{L} = 0.00101\text{L}$; C_{pr} : 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, $50\mu\text{L} = 0.05\text{mL}$; 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:

1. 试剂-C、试剂-D 临用前配制, 配好未使用完的 4°C 可保存两天。



源叶