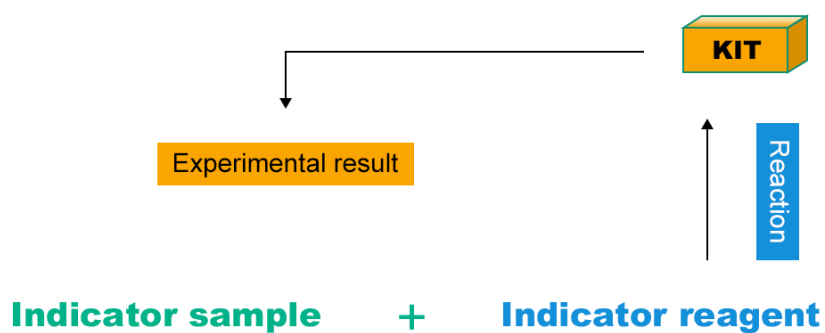


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0438

Size: 100T/96S

NADPH-细胞色素 C 还原酶 (NCR) 活性测定试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、测定原理:

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。

三、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、微量石英比色皿/96 孔板和蒸馏水。

四、试剂的组成和配制:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	粉剂×2 瓶	4℃保存	临用前根据用量每瓶加 100mL 蒸馏水充分溶解
试剂二	液体×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂×1 管	-20℃保存	临用前配制, 加 1.04 mL 蒸馏水充分溶解, 4℃保存
试剂四	粉剂×1 管	4℃保存	临用前配制, 加 1100μL 蒸馏水充分溶解, 4℃保存

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 试剂一，冰上充分研磨，10000g 4℃离心 30min，取上清液，转移到超速离心管中。

2、**粗制微粒体**：4℃，100000g，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，100000g 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，盖紧后充分震荡溶解，4℃保存待测。
NADPH-细胞色素 C 还原酶测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长到 550nm，蒸馏水调零。

2. 试剂二在 37℃水浴中预热 30min。

3. **空白管**：取微量石英比色皿/96 孔板，依次加入 10μL 蒸馏水、180μL 试剂二、10μL 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 10s 和第 130s 吸光值。
 ΔA 空白管=A2-A1。

4. **测定管**：取微量石英比色皿/96 孔板，依次加入 10μL 提取液、180μL 试剂二、10μL 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 10s 和第 130s 吸光值。
 ΔA 测定管=A4-A3。

注意：空白管只需做一次。

NCR 活性计算公式公式：

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

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。

$$NCR ((nmol/min/mg \text{ prot}) = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T = 550 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div Cpr$$

(2) 按样本质量计算

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。

$$NCR ((nmol/min/g \text{ 鲜重}) = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T = 275 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

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(cm), 1cm; V 反总: 反应体系总体积(L), 210μL=2.1×10⁻⁴L; 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(mL), 10μL=0.01mL; V 样总: 提取液体积, 0.5 mL; T: 反应时间(min), 2min。

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

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

$$\text{NCR ((nmol/min/mg prot))} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\varepsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T = 1100 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

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

$$\text{NCR ((nmol/min/g 鲜重))} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\varepsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T = 550 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

ε : 还原型细胞色素 C 摩尔消光系数, 19100L/mol/cm=0.0191L/ μ mol/cm; d: 96 孔板光径(cm), 0.5cm; V 反总: 反应体系总体积(L), 210 μ L=2.1 $\times 10^{-4}$ L; 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(mL), 10 μ L=0.01mL; V 样总: 提取液 体积, 0.5mL; T: 反应时间(min), 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。