

NADPH-细胞色素C还原酶 (NCR) 活性检测试剂盒 (微量法)

产品货号: BA1235

产品规格: 100管/96样

产品简介:

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。

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。

注意: 正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	粉剂×2瓶	4℃
试剂二	液体×1瓶	4℃
试剂三	粉剂×1管	-20℃
试剂四	粉剂×1管	4℃

溶液的配制:

1. 试剂一: 临用前根据用量每瓶加100mL蒸馏水充分溶解。
2. 试剂三: 临用前配制, 加1.04mL蒸馏水充分溶解, 4℃保存。
3. 试剂四: 临用前配制, 加1100μL蒸馏水充分溶解, 4℃保存。

需自备的仪器和用品:

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。

操作步骤:

一、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1mL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1mL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。

二、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。 $\Delta A_{\text{空白管}} = A_2 - A_1$ 。
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。 $\Delta A_{\text{测定管}} = A_4 - A_3$ 。

注意: 空白管只需做一次。

三、NCR活性计算公式:

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

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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

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

(2) 按样本质量计算

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

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

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; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积 (L), 210 μL =2.1 $\times 10^{-4}$ L; Cpr : 上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积 (mL), 10 μL =0.01mL; $V_{\text{样总}}$: 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℃中，每毫克蛋白每分钟催化产生1 μmol 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℃中，每克组织每分钟催化产生1 μmol 还原型细胞色素c为1个酶活单位。

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

ϵ : 还原型细胞色素C摩尔消光系数, 19100L/mol/cm=0.0191L/ μmol /cm; d : 96孔板光径 (cm), 0.5cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积 (L), 210 μL =2.1 $\times 10^{-4}$ L; Cpr : 上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积 (mL), 10 μL =0.01mL; $V_{\text{样总}}$: 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℃可保存两天。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com