



细胞色素 b5 检测试剂盒说明书(精简版)

(货号 A134-1-1 Cytochrome b5 分光光度法 50T/48 样)

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,对外源物质代谢具有重要的作用,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。

二、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,通过测定424nm和490nm的吸光度差异即可计算出细胞色素b5的含量。

三、仪器设备:

可见分光光度计、普通离心机、高速离心机、可调式移液器、1mL玻璃比色皿、蒸馏水。

四、试剂组成:(试剂盒有效期3个月)

试剂一:粉剂×1瓶,4℃保存。临用前加100ml蒸馏水,充分溶解。

试剂二:液体×1瓶,4℃保存。

试剂三:粉剂×1瓶,4℃保存。

工作液配制:戴一次性手套小心打开试剂三瓶盖,加试剂二50ml充分溶解,4℃避光可保存一周。

五、操作步骤:

1、细胞色素 b5 提取:

- (1)、除去线粒体、细胞核等大分子物质:称取 0.5g 组织,加入 1ml 试剂一冰水浴充分碾磨破碎,10000g4℃离心 30 分钟取上清转入高速离心管中。
- (2)、粗制微粒体:10000g,4℃离心 60 分钟,弃上清。
- (3)、除血红蛋白等杂质:向上步留的沉淀中加 1ml 的试剂一,盖紧后充分震荡溶解,10000g,4℃离心 30 分钟,弃上清。
- (4)、待测液:向上步留的沉淀中加试剂二 0.5ml,盖紧后充分震荡溶解,需要当天检测。

2、操作表:

试剂名称	测定管	空白管
蒸馏水 (μL)		50
待测液 (μL)	50	
工作液 (μL)	1000	1000
室温静置2分钟,424nm读A1,490nm读A2		

注:空白管只需做 1 管。

六、单位定义与计算公式:

1、按蛋白浓度计算:

$$\text{细胞色素b5含量} \frac{(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{反总}}}{(\varepsilon \times d \times C_{\text{Pr}} \times V_{\text{样}})} = 0.123 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}$$

(nmol/mgprot)

2、按样本鲜重计算:

$$\text{细胞色素b5含量} \frac{(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}}}{(\varepsilon \times d \times V_{\text{样}} \times W)} = 0.0614 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W$$

(nmol/g)

注: V 反总:反应体系总体积,1.05mL;

V 样:加入样本体积,0.05mL;

V 样总:待测液总体积,0.5 mL;

Cpr:样本蛋白质浓度,mg/mL;

W:样本质量,g。

ε:还原型细胞色素b5纳摩尔消光系数,171×10⁻³

d:比色皿光径:1cm