

NADPH-细胞色素c还原酶(NCR)试剂盒说明书(精简版)

(货号: A132-1-1 NADPH-Cytochrome-c Reductase, 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,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处有独特吸收峰;通过测定550nm吸光度的增加速率,来计算NCR活性。

三、需自备的仪器和用品:

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

四、试剂的组成和配制:

试剂一: 粉剂×1瓶, 4℃保存; 临用前加入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, -20℃保存; 临用前加入2.60mL 蒸馏水充分溶解, 4℃保存。

试剂四: 粉剂×1瓶, 4℃保存; 临用前加入550μL 蒸馏水充分溶解, 4℃保存。

五、粗酶液提取:

- ① 称取约0.5g组织, 加入4℃预冷的1mL试剂一, 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 在4℃, 100,000g离心60min, 弃上清液;
- ③ 在沉淀中加入1mL试剂一, 盖紧后充分震荡溶解, 100,000g离心30min, 弃上清液;
- ④ 向上步骤沉淀中加入0.5mL试剂二, 盖紧后充分震荡溶解, 4℃保存待测。

六、测定步骤:

- 1、分光光度计预热30min 以上, 调节波长至550nm, 蒸馏水调零;
- 2、试剂二在37℃水浴预热30min以上;
- 3、样本测定
 - (1) 空白管: 取1mL玻璃比色皿, 一次加入50μL蒸馏水、900μL试剂二、50μL试剂三和10μL试剂四, 迅速混匀后于550nm处分别测定第10s吸光值 A_1 和第130s吸光值 A_2 , 计算 $\Delta A_{\text{空白}}=A_2-A_1$ 。
 - (2) 测定管: 取1mL玻璃比色皿, 一次加入50μL粗酶液、900μL试剂二、50μL试剂三和10μL试剂四, 迅速混匀后于550nm处分别测定第10s吸光值 A_3 和第130s吸光值 A_4 ; 计算 $\Delta A_{\text{测定}}=A_4-A_3$ 。

注: 当样本数量比较巨大时, 只需要做一个空白管。

七、NCR 活力单位的计算

1、按照蛋白浓度的计算:

单位定义: 37℃反应条件下, 每mg蛋白每分钟催化产生1nmol还原型细胞色素c定义为1U;

$$\begin{aligned} \text{NCR (U/mg prot)} &= (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 529 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2、按样本质量计算:

单位定义: 37℃反应条件下, 每g样品每分钟催化产生1nmol还原型细胞色素c定义为1U;

$$\begin{aligned} \text{NCR (U/g)} &= (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 265 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W \end{aligned}$$

ϵ : 还原型细胞色素c在550nm处摩尔吸光系数为 $1.91 \times 10^4 \text{ L/mol/cm} = 0.0191 \text{ L/}\mu\text{mol/cm}$;

d : 比色皿光径 (cm), 1cm;

$V_{\text{反应}}$: 反应体系总体 (L), $1010\mu\text{L} = 1.01 \times 10^{-3} \text{ L}$;

Cpr : 上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定, 建议使用本公司BCA 蛋白质含量测定试剂盒;

$V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积 (mL), $50\mu\text{L} = 0.05 \text{ mL}$;

$V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积 (mL), 0.5mL;

T : 催化反应时间 (min), 2min;

W : 样本质量, (g)。