

红霉素-N-脱甲基酶(ERND)活性检测试剂盒说明书

(货号: ADS-W-D048 微板法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

细胞色素 P450 酶是一组主要存在于肝脏的酶系, 在外源物质代谢中, 尤其是药物和毒物的代谢, 具有重要作用。ERND 在 P450 酶系中相当于 CYP2B 亚型, 与药物代谢的去甲基化密切相关。CYP2B 具有催化底物形成非活性易于排泄的代谢产物而具有解毒作用, 也可使某些药物经 CYP2B 代谢活化。

ERND 催化红霉素释放甲醛, 通过 Nash 比色测定甲醛含量, 即可计算出 ERND 活性。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
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 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加 1mL 蒸馏水, 充分溶解。
试剂四	粉剂×1 瓶	-20℃保存	临用前加 0.5mL 蒸馏水, 充分溶解。
试剂五	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前, 加蒸馏水 4.5mL 充分溶解。
试剂六	液体 5ml×1 瓶	4℃保存	
试剂七	液体 10ml×1 瓶	4℃保存	
标准品	液体 1ml×1 瓶	-20℃保存	临用前取 1.5mL EP 管, 加入 10μl 标准液, 加 990μl 蒸馏水, 混匀即为 0.05 mmol/L 标准甲醛溶液, 4℃保存。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、**超速离心机**、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

- (1) 除去细胞核, 线粒体等大分子物质: 称约 0.5g 组织, 加入 1 mL 试剂一, 冰上充分研磨, **10 000g** 4℃离心 30min, 取上清液转入超速离心管。
- (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 1mL 试剂一, 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 的沉淀中加试剂二 0.5 mL, 盖紧后充分震荡溶解, 即粗酶液, 待测。该待测液需当天使用。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000:1 的比例进行提取。

2、检测步骤:

- ① 打开分光光度计预热 30min (等待仪器过自检程序亦可), 设定波长到 412nm, 蒸馏水调零。
- ② 试剂二置于 37℃水浴中预热 30min 以上。
- ③ 按下表在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管 (仅做一次)
粗酶液	10	10	-
标准品	-	-	100
蒸馏水	-	10	-
试剂二	170	170	-
试剂三	10	10	-
试剂四	10	-	-
混匀后置于 37℃ 水浴保温 30min, 立即加入			
试剂五	35	35	-
混匀后置于冰浴中 5min; 取出后加入			
试剂六	35	35	-
混匀后室温静置 5min; 室温 8000rpm 离心 5min; 取新的 EP 管, 加入 100μL 上清液			
试剂七	100	100	100
混匀后 60℃ 水浴 10min, 然后取出, 用冷水冷却 5min, 于 412nm 测定光吸收。			

【注】：1.若△A 小于 0.01, 则可增加样本质量 W 或细胞数量, 则改变后的 W 或细胞数量需带入公式重新计算。

五、结果计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：活性单位 (U) 定义：37℃ 中每分钟每毫克蛋白催化产生 1μmol 甲醛。

$$\text{ERND 活性(U/mg prot)} = C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div A \text{ 标准管} \times \text{稀释倍数} \div (C_{\text{pr}} \times V \text{ 样}) \div T$$

$$= 0.045 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div A \text{ 标准管} \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

活性单位 (U) 定义：37℃ 中每分钟每克组织催化产生 1μmol 甲醛。

$$\text{ERND 活性(U/g 鲜重)} = C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div A \text{ 标准管} \times \text{稀释倍数} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T$$

$$= 0.0225 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div A \text{ 标准管} \div W$$

W---取样质量, g;

C 标准品: 0.05 mmol/L=50μmol/L;

稀释倍数: $V \text{ 反总} \div V \text{ 上清液} = (50+850+50+50+175+175) \div 500=2.7$;

V 样: 加入粗酶液体积, 50μL=0.05mL;

V 样总: 提取液体积, 0.5 mL;

V 标准品: 500μL=0.0005 L;

T: 催化反应时间 (min), 30min;

Cpr---上清液蛋白浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。