

细胞色素 b5 (Cytochrome b5) 含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-D049 微板法 96 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。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。

氧化型细胞色素 b5 经连二亚硫酸钠还原后, 在 424nm 处有最大吸收峰, 通过测定 424nm 和 490nm 处吸光值的差异, 即可计算出细胞色素 b5 的含量。

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×2 瓶	4℃保存	每瓶: 临用前加 100mL 蒸馏水, 充分溶解。
试剂二	液体 76mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂×1 瓶	4℃避光保存	
工作液配制: 临用前配制, 戴一次性手套, 小心打开试剂三瓶盖, 加试剂二 20mL 充分溶解, 4℃避光可保存 1 周。			

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)、离心管、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)、96 孔板、酶标仪。

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 1mL 试剂一, 冰上充分研磨, 10 000g 4℃离心 30min, 取上清液, 转入超速离心管中。

2、粗制微粒体: 100 000g, 4℃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、待测液: 向步骤 3 的沉淀中加试剂二 0.5mL, 盖紧后充分震荡溶解, 即待测液, 该待测液需当天测定。

【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 酶标仪预热 30min (等待仪器过自检程序亦可), 设定波长到 424nm/490nm。

② 工作液置于 25℃水浴中预热 30 min 以上。

③ 按下表在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
蒸馏水	-	150
样本	10	-

工作液	200	200
室温静置 2 min, 分别于 424nm 和 490nm 处吸光值, 424nm 处吸光值记为 A1, 490nm 处吸光值记为 A2。△A = A1 - A2。		

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

五、结果计算：

(1) 按蛋白浓度计算

细胞色素 b5 含量(nmol/mg prot)

$$= (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}})$$

$$= 0.2456 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

细胞色素 b5 含量 (nmol/g 样品)

$$= (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times (V_{\text{样总}} \div V_{\text{样}}) \div W$$

$$= 0.1228 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W$$

W---取样质量, g;

d: 96 孔板光径 (cm), 0.5cm;

ε: 还原型细胞色素 b5 纳摩尔消光系数, $171 \times 10^3 \text{ L/nmol/cm}$;

V 样: 加入反应体系中待测液体积, $10 \mu\text{L} = 0.01 \text{ mL}$; V 样总: 待测液总体积, 0.5 mL;

V 反总: 反应体系总体积, $210 \mu\text{L} = 2.1 \times 10^{-4} \text{ L}$;

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