

细胞色素 b5(Cytochrome b5)含量测定试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

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。

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。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。

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 的含晕。

自备仪器和用品：

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、微量玻璃比色皿/96 孔板、和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：粉剂核 2 瓶，4℃ 保存。临用前各加 100mL 蒸馏水，充分溶解。

试剂二：液体核 1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：粉剂核 1 瓶，4℃ 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。

样品中细胞色素 b5 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。

细胞色素 b5 含量

测定操作:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min。
2. 工作液置于 25°C 水浴中预热 30 min。
3. **空白管:** 取 1mL 玻璃比色皿, 加入 10 μL 蒸馏水, 200μL 工作液, 室温静置 2 min, 424nm 和 490nm 处吸光值, 424nm 处吸光值记为 A 空白管 1, 490nm 处吸光值记为 A 空白管 2。

$$\Delta A \text{ 空白管} = A \text{ 空白管 1} - A \text{ 空白管 2}$$

4. **测定管:** 取 1mL 玻璃比色皿, 加入 10 μL 待测液, 200μL 工作液, 室温静置 2 min, 424nm 和 490nm 处吸光值, 424nm 处吸光值记为 A 测定管 1, 490nm 处吸光值记为 A 测定管 2。

$$\Delta A \text{ 测定管} = A \text{ 测定管 1} - A \text{ 测定管 2}。$$

注意: 只需要做一个空白管。

样品细胞色素 b5 含量计算公式:

a. 使用微晕石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{细胞色素 b5 含晕}(\text{nmol/mg prot}) &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\varepsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \\ &\times V \text{ 样}) \\ &= 0.1228 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{细胞色素 b5 含晕}(\text{nmol/g 鲜重}) &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\varepsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times (V \text{ 样} \\ &\text{总} \div V \text{ 样}) \div W \\ &= 0.0614 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W \end{aligned}$$

ε : 还原型细胞色素 b5 纳摩尔消光系数, $171 \times 10^{-3} \text{ L/nmol/cm}$; d : 比色皿光径(cm), 1cm; $V \text{ 反总}$: 反应体系总体积, $210 \mu\text{L} = 2.1 \times 10^{-4} \text{ L}$; Cpr : 待测液蛋白质浓度(mg/mL), 需要另外测定; $V \text{ 样}$: 加入反应体系中待测液体积, $10 \mu\text{L} = 0.01 \text{ mL}$; $V \text{ 样总}$: 待测液总体积, 0.5 mL; W : 样品质量(g)。

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{细胞色素 b5 含晕}(\text{nmol/mg prot}) &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\varepsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \\ &\times V \text{ 样}) \\ &= 0.2456 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{细胞色素 b5 含晕}(\text{nmol/g 鲜重}) &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\varepsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times (V \text{ 样} \\ &\text{总} \div V \text{ 样}) \div W \\ &= 0.1228 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W \end{aligned}$$

ε : 还原型细胞色素 b5 纳摩尔消光系数, $171 \text{ 核 } 10^{-3} \text{ L/nmol/cm}$; d : 96 孔板光径(cm), 0.5cm;

$V \text{ 反总}$: 反应体系总体积, $210 \mu\text{L} = 2.1 \text{ 核 } 10^{-4} \text{ L}$; Cpr : 待测液蛋白质浓度(mg/mL), 需要

另外测定;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;W: 样品质晕(g)。



Lifemall.asia

To be with you