

细胞色素 b5(Cytochrome b5) 含量测定

试剂盒试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 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：

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：

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

试剂组成和配制：

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 临用前配制，戴一次性手套，小心打开试剂三瓶盖，加试剂二 50 mL 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，10000g 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。

细胞色素 b5 含晕测定操作:

1. 分光光度计预热 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 50 μL **蒸馏水**, 1000μL 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。ΔA 空白管= A 空白管 1- A 空白管 2
4. **测定管**: 取 1mL 玻璃比色皿, 加入 50 μL **待测液**, 1000μL 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。ΔA 测定管= A 测定管 1- A 测定管 2。

注意: 只需要做一个空白管。

样品细胞色素 b5 含晕计算公式:

(1). 按照蛋白浓度计算:

细胞色素 b5 含晕(nmol/mg prot)=(ΔA 测定管-ΔA 空白管)÷ ε ÷ d×V 反总÷(Cpr×V 样)

$$= 0.123 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div Cpr$$

(2). 按照样本质量计算:

细胞色素 b5 含晕(nmol/g 鲜重) = (ΔA 测定管-ΔA 空白管)÷ ε ÷ d×V 反总×(V 样总÷V 样) ÷ W

$$= 0.0614 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

ε: 还原型细胞色素 b5 纳摩尔消光系数, 171×10^3 L/nmol/cm; d: 比色皿光径(cm), 1cm; V 反总: 反应体系总体积, 1.05 mL=0.00105 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, 50 μL=0.05 mL; V 样总: 待测液总体积, 0.5 mL; W: 样品质量, g。