

细胞色素 b5 (Cytochrome b5) 含量测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

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 的含量。

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×2 瓶，4℃ 保存。临用前各加 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 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℃ 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。
 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 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。
 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 含量计算公式：

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

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

(2) 按样本质量计算

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

ϵ : 还原型细胞色素 b5 纳摩尔消光系数, 171×10^{-3} L/nmol/cm; d : 比色皿光径 (cm), 1cm; V 反总: 反应体系总体积, $210 \mu\text{L} = 2.1 \times 10^{-4}$ L; C_{pr} : 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, $10 \mu\text{L} = 0.01$ mL; V 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

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

(2) 按样本质量计算

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

ϵ : 还原型细胞色素 b5 纳摩尔消光系数, 171×10^{-3} L/nmol/cm; d : 96 孔板光径 (cm), 0.5cm; V 反总: 反应体系总体积, $210 \mu\text{L} = 2.1 \times 10^{-4}$ L; C_{pr} : 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, $10 \mu\text{L} = 0.01$ mL; V 样总: 待测液总体积, 0.5 mL; W : 样品质量 (g)。