

红霉素-N-脱甲基酶 (Erythromycin N-demethylase, ERND) 试剂盒 说明书

分光光度法 50 管/24 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。

测定原理：

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。

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、蒸馏水和冰。

试剂组成和配制：

试剂一：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加 50 mL 蒸馏水溶解。

试剂二：液体×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加 2.6 mL 蒸馏水，充分溶解。

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加 2.6 mL 蒸馏水，充分溶解。

试剂五：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前，加蒸馏水 9 mL 充分溶解。

试剂六：液体×1 瓶，4℃ 保存。

试剂七：液体×1 瓶，4℃ 保存。

标准液：液体×1 瓶，-20℃ 保存。临用前取 1.5 mL 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。

粗酶液提取：

- 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、最终微粒体：向步骤 3 的沉淀中加试剂二 0.5mL，充分震荡溶解，即**粗酶液**，待测。该待测液需当天使用。

测定操作：

1. 分光光度计预热 30 min 以上，调节波长到 412 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂二置于 37℃ 水浴中预热 30 min。
3. **对照管**：取 1 支 EP 管，加入 50μL 粗酶液，850μL 试剂二，50μL 试剂三，**50μL 蒸馏水**，混匀后置于 37℃ 水浴保温 30min；立即加入 175μL 试剂五，混匀后置于冰浴中 5min；取出后加入 175μL 试剂六，混匀后室温静置 5min；室温 8000rpm 离心 5min；取新的 EP 管，加入 500μL 上清液，500μL 试剂七，混匀后 **60℃ 水浴 10min**，然后取出，用冷水冷却 5min，于 412nm 测定光吸收，记为 A 对照管。
4. **测定管**：取 1 支 EP 管，加入 50μL 粗酶液，850μL 试剂二，50μL 试剂三，**50μL 试剂四**，混匀后置于 37℃ 水浴保温 30min；立即加入 175μL 试剂五，混匀后置于冰浴中 5min；取出后加入 175μL 试剂六，混匀后室温静置 5min；室温 8000rpm 离心 5min；取 1 支新 EP 管，

加入 500 μ L 上清液, 500 μ L 试剂七, 混匀后 60 $^{\circ}$ C 水浴 10min, 然后取出, 用冷水冷却 5min, 于 412nm 测定光吸收, 记为 A 测定管。

5. **标准管**: 取 1 支 EP 管, 加入 500 μ L 标准品, 500 μ L 试剂七, 混匀后 60 $^{\circ}$ C 水浴 10min, 然后取出, 用冷水冷却 5min, 于 412nm 测定光吸收, 记为 A 标准管。

注意: 每个样品都需要做对照管。

ERND 活性计算公式:

(1) 按照蛋白浓度计算:

活性单位定义: 37 $^{\circ}$ C 下, 每分钟每毫克蛋白催化产生 1nmol 甲醛为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{ERND 活性(nmol/min/mg prot)} &= C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \times \\ &\quad \text{稀释倍数} \div (C_{\text{pr}} \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 45 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \div C_{\text{pr}}. \end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算:

活性单位定义: 37 $^{\circ}$ C 下, 每分钟每克样品催化产生 1nmol 甲醛为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{ERND 活性(nmol/min/g 鲜重)} &= C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \times \\ &\quad \text{稀释倍数} \div (W \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 45 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \div W \end{aligned}$$

C 标准品: 0.05 mmol/L=50 μ mol/L; V 标准品: 500 μ L=0.0005 L; 稀释倍数: $V \text{ 反总} \div V \text{ 上清液} = (50+850 +50+50+175+175) \div 500=2.7$; C_{pr}: 粗酶液蛋白质浓度, mg/mL, 需要另外测定, 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒; V 样: 加入粗酶液体积, 50 μ L=0.05mL; W: 样本质量, g; T: 催化反应时间, 30min。