

NADPH-细胞色素 C 还原酶 (NCR) 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：

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。NCR 作为 P450 酶系的重要一员，催化氧化型 P450 还原再生。

测定原理：

NCR 催化 NADPH 还原氧化型细胞色素 c 生成还原型细胞色素 c，还原型细胞色素 c 在 550nm 处有特征吸收峰；通过测定 550nm 吸光度的增加速率，来计算 NCR 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，-20℃ 保存。临用前配制，加 2.6 mL 蒸馏水充分溶解，4℃ 保存。

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前配制，加 550 μL 蒸馏水充分溶解，4℃ 保存。

粗酶液提取：

- 1、除去细胞核和线粒体等：称约 0.5g 组织，加入 4℃ 预冷的 1 mL 试剂一，冰上充分研磨，10 000g 4℃ 离心 30min，取上清液，转移到超速离心管中。
- 2、粗制微粒体：4℃，100 000g，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 1 mL 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 0.5 mL，盖紧后充分震荡溶解，4℃ 保存待测。

测定操作：

1. 分光光度计预热 30 min，调节波长到 550 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂二在 37℃ 水浴中预热 30min。
3. 空白管：取 1mL 玻璃比色皿，依次加入 50μL 蒸馏水、900μL 试剂二、50μL 试剂三和 10μL 试剂四，迅速混匀后于 550nm 处测定 2min 内吸光值变化，第 10 s 和第 130 s 吸光值分别记为 A1 和 A2， ΔA 空白管=A2-A1。
4. 测定管：取 1mL 玻璃比色皿，依次加入 50μL 粗酶液、900μL 试剂二、50μL 试剂三和 10μL 试剂四，迅速混匀后于 550nm 处测定 2min 内吸光值变化，第 10 s 和第 130 s 吸光值分别记为 A3 和 A4， ΔA 测定管=A4-A3。

注意：空白管只需要做一次。

计算公式：

(1).按照蛋白浓度计算

活性单位定义：37℃ 中，每毫克蛋白每分钟催化产生 1nmol 还原型细胞色素 C 为 1 个酶活单位。

$$\text{NCR 酶活性 (nmol/min/mg prot)} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \\ = 529 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

(2)按照样本质量计算

活性单位定义：37℃ 中，每克样品每分钟催化产生 1nmol 还原型细胞色素 C 为 1 个酶活单位。

NCR 酶活性(nmol/min/g 鲜重) = $(\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$

$$= 265 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W$$

ϵ : 还原型细胞色素 C 摩尔消光系数, $19100\text{L/mol/cm} = 0.0191\text{L}/\mu\text{mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $1010\mu\text{L} = 0.00101\text{L}$; C_{pr} : 上清液蛋白质浓度, mg/mL, **需要另外测定**; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中上清液体积, $50\mu\text{L} = 0.05\text{mL}$; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 0.5mL; W : 样本质量, g; T : 反应时间, 2min。

注意事项:

试剂三、试剂四临用前配制, 配好未使用完的 4°C 可保存两天。