



NADPH-细胞色素 C 还原酶活性检测试剂盒

NCR Assay Kit

可见分光光度法

产品编号: AK523V

产品规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

| 编号 | 规格 | 储存条件 |
|---------|--------|--|
| AK523-A | 粉剂×1 瓶 | 4℃保存; 临用前根据用量每瓶加 100mL 蒸馏水充分溶解。 |
| AK523-B | 液体×1 瓶 | 4℃保存; |
| AK523-C | 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。 |
| AK523-D | 粉剂×1 瓶 | 4℃保存; 临用前配制, 加 550μL 蒸馏水充分溶解, 4℃保存。 |

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

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。NADPH-细胞色素 C 还原酶 (NADPH cytochrome c reductase, NCR) 作为 P450 酶系的重要一员, 催化氧化型 P450 还原再生。

原理: NCR 催化 NADPH 还原氧化型细胞色素 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。

自备用品:

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

粗酶液提取:

- 除去细胞核和线粒体等:** 称约 0.5g 组织, 加入 4℃预冷的 1 mL AK523-A, 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。
- 粗制微粒体:** 4℃, 100 000g, 离心 60min, 弃上清液。
- 除血红蛋白等杂质:** 向步骤 2 的沉淀中加 1 mL AK523-A, 盖紧后充分震荡溶解, 100 000g 离心 30min, 弃上清液。
- 最终微粒体:** 向步骤 3 的沉淀中加 AK523-B 0.5 mL, 盖紧后充分震荡溶解, 4℃保存待测。

测定步骤:

- 分光光度计预热 30 min, 调节波长到 550 nm, 蒸馏水调零。
- AK523-B 在 37℃水浴中预热 30min。
- 取 1ml 石英比色皿依次加入下列试剂:

| | 空白管 (μL) | 测定管 (μL) |
|---|----------|----------|
| 蒸馏水 | 50 | |
| AK523-B | 900 | |
| AK523-C | 50 | |
| AK523-D | 10 | |
| 迅速混匀后于 550nm 处测定 2min 内吸光值变化, 第 10s 和第 130s 吸光值。 $\Delta A_{\text{空白管}} = A_2 - A_1$ 。 | | |
| 提取液 | | 50 |
| AK523-B | | 900 |
| AK523-C | | 50 |

| | | |
|--|--|----|
| AK523-D | | 10 |
| 迅速混匀后于 550nm 处测定 2min 内吸光值变化，第 10s 和第 130s 吸光值。 ΔA 测定管=A4-A3。 | | |

注意：空白管只需做一次。

NCR 活性计算公式：

1. 按蛋白浓度计算

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

NCR (nmol/min /mg prot)

$$= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T$$

$$= 529 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

2. 按样本鲜重计算

活性单位定义：37℃中，每克组织每分钟催化产生 1 μ mol 还原型细胞色素 C 为 1 个酶活单位。

NCR (nmol/min/g 鲜重)

$$= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T$$

$$= 625 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

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

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))

注意事项：

- AK523-C、AK523-D 临用前配制，配好未使用完的 4℃可保存两天。