

## NADPH-细胞色素 C 还原酶 (NCR) 活性测定试剂盒说明书

微量法 100 管/96 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，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：

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、微量石英比色皿/96 孔板和蒸馏水。

### 试剂组成和配置：

试剂一：粉剂×2 瓶，4℃ 保存。临用前根据用量每瓶加 100mL 蒸馏水充分溶解。

试剂二：液体×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：粉剂×1 管，-20℃ 保存。临用前配制，加 1.04 mL 蒸馏水充分溶解，4℃ 保存。

试剂四：粉剂×1 管，4℃ 保存。临用前配制，加 1100 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。

### NADPH-细胞色素 C 还原酶测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热 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：**取微量石英比色皿/96 孔板，依次加入 10μL 蒸馏水、180μL 试剂二、10μL 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 10s 和第 130s 吸光值。 $\Delta A$  空白管=A2-A1。
4. **测定管：**取微量石英比色皿/96 孔板，依次加入 10μL 提取液、180μL 试剂二、10μL 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 10s 和第 130s 吸光值。 $\Delta A$  测定管=A4-A3。

**注意：**空白管只需做一次。

### NCR 活性计算公式公式：

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

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

$$\begin{aligned} \text{NCR ((nmol/min /mg prot))} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反应} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \\ &= 550 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

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

$$\text{NCR ((nmol/min/g 鲜重))} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T \\ = 275 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

ε: 还原型细胞色素 C 摩尔消光系数, 19100L/mol/cm=0.0191L/μmol/cm; d: 比色皿光径(cm), 1cm; V 反总: 反应体系总体积 (L), 210μL=2.1×10<sup>-4</sup>L; 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 (mL), 10μL=0.01mL; V 样总: 提取液体积, 0.5 mL; T: 反应时间 (min), 2min 。

b.使用 96 孔板测定的计算公式如下

(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 1μmol 还原型细胞色素 C 为 1 个酶活单位。

$$\text{NCR ((nmol/min/mg prot))} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T \\ = 1100 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div Cpr$$

(2) 按样本质量计算

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

$$\text{NCR ((nmol/min/g 鲜重))} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T \\ = 550 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

ε: 还原型细胞色素 C 摩尔消光系数, 19100L/mol/cm=0.0191L/μmol/cm; d: 96 孔板光径(cm), 0.5cm; V 反总: 反应体系总体积 (L), 210μL=2.1×10<sup>-4</sup>L; 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 (mL), 10μL=0.01mL; V 样总: 提取液体积, 0.5mL; T: 反应时间 (min), 2min 。

**注意事项:**

试剂三、试剂四临用前配制，配好未使用完的 4℃可保存两天。