



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×2 瓶	4℃保存; 临用前取一瓶加 50mL 蒸馏水充分溶解, 用不完的试剂可保存 4 周;
AK523-B	80mL×1 瓶	4℃保存;
AK523-C	粉剂×2 瓶	-20℃保存; 临用前取一瓶加 1.3 mL 蒸馏水充分溶解, 用不完的试剂-20℃分装保存 2 周, 避免反复冻融;
AK523-D	粉剂×2 支	4℃保存; 临用前取一瓶加 275μL 蒸馏水充分溶解, 用不完的试剂-20℃分装保存 4 周, 避免反复冻融。

※ 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、恒温培养箱/水浴锅、1mL 玻璃比色皿、低温离心机、超速离心机、可调式移液枪、冰和蒸馏水。

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 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。
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 AK523-A, 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 AK523-B 0.5 mL, 盖紧后充分震荡溶解, 4℃保存待测。

测定步骤:

1. 分光光度计预热 30 min, 调节波长到 550 nm, 蒸馏水调零。
2. AK523-B 在 37℃水浴中预热 30min。
3. 取 1ml 玻璃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。		

△A 空白管=A2-A1。		
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。 △A 测定管=A4-A3。		

注意：空白管只需做 1-2 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 1μmol 还原型细胞色素 C 为 1 个酶活单位。

$$\text{NCR (U/mg prot)} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T = 0.529 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

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 1μmol 还原型细胞色素 C 为 1 个酶活单位。

$$\text{NCR (U/g 鲜重)} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T = 0.265 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

注：ε：还原型细胞色素 C 摩尔消光系数，19100L/mol/cm=0.0191L/μmol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 反总：反应体系总体积，1010μL=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，50μL=0.05mL；V 样总：样本处理中最后加入 AK523-B 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：

1. 若吸光值 A>1.2 或 ΔA>0.8，建议稀释样本后再测定，计算公式中乘以稀释倍数。
2. 若吸光值较低或接近空白 OD 值，建议增加样本量后再进行测定，注意同步修改计算公式。