



红霉素-N-脱甲基酶活性检测试剂盒

ERND Assay Kit

微量法

产品编号: AK526M

产品规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK526-A	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加 100mL 蒸馏水充分溶解。
AK526-B	液体×1 瓶	4℃保存;
AK526-C	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加入 1mL 蒸馏水, 充分溶解。
AK526-D	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加入 0.5mL 蒸馏水, 充分溶解。
AK526-E	粉剂×1 瓶	4℃保存; 临用前加蒸馏水 4.5 mL 充分溶解。
AK526-F	液体×1 瓶	4℃保存;
AK526-G	液体×1 瓶	4℃保存;
AK526-S	液体×1 瓶	-20℃保存。临用前取 AK526-S 10μl+ 990μl 蒸馏水, 混匀即为 0.05 mmol/L 标准甲醛溶液, 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。红霉素-N-脱甲基酶 (Erythromycin N-demethylase, 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。

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。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、普通离心机, 超速离心机、可调式移液枪、蒸馏水和冰。

粗酶液提取:

1. **除去细胞核和线粒体等大分子物质:** 称约 0.5g 组织, 加入 1 mL 4℃预冷的 AK526-A, 冰上充分研磨, 10 000g 4℃离心 30min, 取上清液转入超速离心管。
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 AK526-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 AK526-B 0.5 mL, 盖紧后充分震荡溶解, 4℃保存待测。
5. **该待测液需当天使用。**

测定步骤:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min, 调节波长到 412 nm, 蒸馏水调零。
2. AK526-B 在 37℃水浴中预热 30min。
3. 取 1.5 mL EP 管依次加入下列试剂:

	对照管 (μL)	测定管 (μL)	标准管 (ul)
粗酶液	10	250	
AK526-B	170	170	
AK526-C	10	10	

AK526-D		10	
蒸馏水	10		
混匀后 37℃水浴中保温 30min; 立即加入			
AK526-E	35	35	
混匀后置于冰浴中 5min; 取出后加入			
AK526-F	35	35	
混匀后室温静置 5min; 室温 8000rpm 离心 5min; 取上清液加入新的 1.5 mL EP 管			
上清液	100	100	
标准品			100
AK526-G	100	100	100
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、A 测定管、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. 按蛋白浓度计算

活性单位定义：37℃下，每分钟每毫克蛋白催化产生 1nmol 甲醛为 1 个酶活单位。

ERND 活性 (nmol/min/mg prot)

$= C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \times \text{稀释倍数} \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T$

$= 45 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \div Cpr。$

2. 按样本鲜重计算

活性单位定义：37℃下，每分钟每克样品催化产生 1nmol 甲醛为 1 个酶活单位。

ERND 活性(nmol/min/g 鲜重)

$= C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \times \text{稀释倍数} \div (W \times V \text{ 样}) \div T$

$= 45 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \div W$

注：C 标准品：0.05 mmol/L=50μmol/L；V 标准品：100μL=1×10⁻⁴ L；稀释倍数：V 反总÷V 上清液=(50+850+50+50+175+175)÷500=2.7；Cpr：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；W：样品质量，g；V 样：加入粗酶液体积，10μL=0.01mL；T：催化反应时间（min），30min。

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