



细胞色素 b5 检测试剂盒

CYB5 Assay Kit

微量法

产品编号: AK527M

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK527-A	粉剂×2 瓶	4℃保存。临用前各加 100mL 蒸馏水, 充分溶解。
AK527-B	液体×1 瓶	4℃保存;
AK527-C	粉剂×1 瓶	4℃保存;
工作液配制:	临用前配制, 戴一次性手套, 小心打开 AK527-C 瓶盖, 加 AK527-B 20mL 充分溶解, 4℃避光可保存 1 周。	

※ 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。细胞色素 P450 和细胞色素 b5 (Cytochrome b5, CYB5) 是 P450 酶系的两个血红素蛋白, 其比值的变化与 P450 代谢活性密切相关。

原理: 氧化型细胞色素 b5 经连二亚硫酸钠还原后, 在 424nm 处有最大吸收峰, 通过测定 424nm 和 490nm 处吸光值的差异, 即可计算出细胞色素 b5 的含量。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、普通离心机, 超速离心机、可调式移液枪和蒸馏水。

样品中细胞色素 b5 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 AK527-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 AK527-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 AK527-B 0.5 mL, 盖紧后充分震荡溶解, 即待测液, 该待测液需当天测定。
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。
2. 工作液置于 25℃水浴中预热 30 min。
3. 取微量玻璃比色皿/96 孔板依次加入下列试剂:

	空白管 (μL)	测定管 (μL)
蒸馏水	10	
待测液		10
工作液	200	200
室温静置 2 min, 424nm 和 490nm 处吸光值, 424nm 处吸光值记为 A 空白管 1、A 测定管 1; 490nm 处吸光值记为 A 空白管 2、A 测定管 2。 $\Delta A \text{ 空白管} = A \text{ 空白管 1} - A \text{ 空白管 2}。$		

$$\Delta A \text{ 测定管} = A \text{ 测定管 1} - A \text{ 测定管 2。}$$

注意：只需要做一个空白管。

CYB5 活性计算公式：

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

$$\text{CYB5 含量 (nmol/mg prot)} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) = 122.8 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

2. 按样本鲜重计算

$$\begin{aligned} \text{CYB5 含量 (nmol/g 鲜重)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times (V \text{ 样总} \div V \text{ 样}) \div W \\ &= 61.4 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W \end{aligned}$$

注： ϵ ：还原型细胞色素 b5 纳摩尔消光系数， $171 \times 10^{-6} \text{ L/nmol/cm}$ ； d ：比色皿光径（cm），1cm； V 反总：反应体系总体积， $210 \mu\text{L} = 2.1 \times 10^{-4} \text{ L}$ ； Cpr ：待测液蛋白质浓度（mg/mL），需要另外测定； V 样：加入反应体系中待测液体积， $10 \mu\text{L} = 0.01 \text{ mL}$ ； V 样总：待测液总体积，0.5 mL； W ：样品质量（g）。

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

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 按蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{CYB5 含量 (nmol/mg prot)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \\ &= 245.6 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2. 按样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{CYB5 含量 (nmol/g 鲜重)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \times (V \text{ 样总} \div V \text{ 样}) \div W \\ &= 122.8 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W \end{aligned}$$

注： ϵ ：还原型细胞色素 b5 纳摩尔消光系数， $171 \times 10^{-6} \text{ L/nmol/cm}$ ； d ：96 孔板光径（cm），0.5cm； V 反总：反应体系总体积， $210 \mu\text{L} = 2.1 \times 10^{-4} \text{ L}$ ； Cpr ：待测液蛋白质浓度（mg/mL），需要另外测定； V 样：加入反应体系中待测液体积， $10 \mu\text{L} = 0.01 \text{ mL}$ ； V 样总：待测液总体积，0.5 mL； W ：样品质量（g）。