



NADPH-细胞色素 C 还原酶活性检测试剂盒

NCR Assay Kit

微量法

产品编号: AK523M
产品规格: 100T/96S
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 管	-20℃保存; 临用前配制, 加 1.04 mL 蒸馏水充分溶解, 4℃保存。
AK523-D	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。

※ 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/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、普通离心机, 超速离心机、可调式移液枪和蒸馏水。

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/酶标仪预热 30 min, 调节波长到 550 nm, 蒸馏水调零。
- AK523-B 在 37℃水浴中预热 30min。
- 取微量石英比色皿/96 孔板依次加入下列试剂:

	空白管 (μL)	测定管 (μL)
蒸馏水	10	
AK523-B	180	
AK523-C	10	
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 空白管=A2-A1。		
提取液		10
AK523-B		180

AK523-C		10
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：

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 1 μ mol 还原型细胞色素 C 为 1 个酶活单位。

NCR (nmol/min /mg prot)

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

$$= 550 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

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)

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

$$= 275 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

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 (cm)，1cm；V 反总：反应体系总体积 (L)，210 μ L=2.1 $\times 10^{-4}$ 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)，10 μ L=0.01mL；V 样总：提取液体积，0.5 mL；T：反应时间 (min)，2min。

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

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 按照蛋白含量计算

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)

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

$$= 1100 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本质量计算

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

NCR (nmol/min/g 鲜重)

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

$$= 550 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$$

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：96 孔板光径 (cm)，0.5cm；V 反总：反应体系总体积 (L)，210 μ L=2.1 $\times 10^{-4}$ 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)，10 μ L=0.01mL；V 样总：提取液体积，0.5mL；T：反应时间 (min)，2min。

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。