

**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。 $\Delta A_{\text{空白管}}=A_2-A_1$ 。
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。 $\Delta A_{\text{测定管}}=A_4-A_3$ 。

**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°C中，每毫克蛋白每分钟催化产生1 $\mu$ mol还原型细胞色素C为1个酶活单位。

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

(2) 按样本质量计算

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

$$\begin{aligned} \text{NCR ((nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 275 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W \end{aligned}$$

$\epsilon$ : 还原型细胞色素C摩尔消光系数, 19100L/mol/cm=0.0191L/ $\mu$ mol/cm; d: 比色皿光径 (cm), 1cm; V反总: 反应体系总体积 (L), 210 $\mu$ L=2.1 $\times$ 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), 10 $\mu$ L=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°C中，每毫克蛋白每分钟催化产生1 $\mu$ mol还原型细胞色素C为1个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{NCR ((nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 1100 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

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

$$\begin{aligned} \text{NCR ((nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 550 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W \end{aligned}$$

$\epsilon$ : 还原型细胞色素C摩尔消光系数, 19100L/mol/cm=0.0191L/ $\mu$ mol/cm; d: 96孔板光径 (cm), 0.5cm; V反总: 反应体系总体积 (L), 210 $\mu$ L=2.1 $\times$ 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), 10 $\mu$ L=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°C可保存两天。