

红霉素-N-脱甲基酶（ERND）活性测定试剂盒说明书

微量法 100T/48S

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。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。

测定原理：

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。

自备仪器和用品：

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

试剂组成和配置：

试剂一：粉剂×1瓶，4℃保存。临用前加100mL蒸馏水溶解。

试剂二：液体×1瓶，4℃保存。

试剂三：粉剂×1管，4℃保存。临用前加1mL蒸馏水，充分溶解。

试剂四：粉剂×1瓶，4℃保存。临用前加0.5mL蒸馏水，充分溶解。

试剂五：粉剂×1瓶，4℃保存。临用前，加蒸馏水4.5mL充分溶解。

试剂六：液体×1瓶，4℃保存。

试剂七：液体×1瓶，4℃保存。

标准液：液体×1瓶，-20℃保存。临用前取1.5mL EP管，加入10μl标准液，加990μl蒸馏水，混匀即为0.05 mmol/L标准甲醛溶液，4℃保存。

粗酶液提取：

- 1、**除去细胞核，线粒体等大分子物质：**称约0.5g组织，加入1mL试剂一，冰上充分研磨，10 000g 4℃离心30min，取上清液，转入超速离心管中。
- 2、**粗制微粒体：**100 000g，4℃，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1mL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的沉淀中加试剂二0.5mL，充分震荡溶解，即粗酶液，待测。该待测液需当天使用。

测定操作：

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. 试剂二置于37℃水浴中预热30 min。
3. **对照管：**取0.5mL EP管，加入10μL粗酶液，170μL试剂二，10μL试剂三，10μL蒸馏水，混匀后置于37℃水浴保温30min；立即加入35μL试剂五，混匀后置于冰浴中5min；取出后加入35μL试剂六，混匀后室温静置5min；室温8000rpm离心5min；取新的EP管，加入100μL上清液，100μL试剂七，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。

4. **测定管**：取0.5mL EP管，加入10 μ L粗酶液，170 μ L试剂二，10 μ L试剂三，10 μ L试剂四，混匀后置于37 $^{\circ}$ C水浴保温30min；立即加入35 μ L试剂五，混匀后置于冰浴中5min；取出后加入35 μ L试剂六，混匀后室温静置5min；室温8000rpm离心5min；取新EP管，加入100 μ L上清液，100 μ L试剂七，混匀后60 $^{\circ}$ C水浴10min，然后取出，用冷水冷却5min，于412nm测定光吸收，记为A测定管。

5. **标准管**：取0.5mL EP管，加入100 μ L标准品，100 μ L试剂七，混匀后60 $^{\circ}$ C水浴10min，然后取出，用冷水冷却5min，于412nm测定光吸收，记为A标准管。

注意：每个样品都需要做对照管。

ERND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).按照蛋白浓度计算：

活性单位定义：37 $^{\circ}$ C下，每分钟每毫克蛋白催化产生1nmol甲醛为1个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{ERND活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= C_{\text{标准品}} \times V_{\text{标准品}} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div A_{\text{标准管}} \times \text{稀释倍数} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 45 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div A_{\text{标准管}} \div C_{\text{pr}}.\end{aligned}$$

(2).按照样本质量计算：

活性单位定义：37 $^{\circ}$ C下，每分钟每克样品催化产生1nmol甲醛为1个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{ERND活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= C_{\text{标准品}} \times V_{\text{标准品}} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div A_{\text{标准管}} \times \text{稀释倍数} \div (W \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 45 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div A_{\text{标准管}} \div W\end{aligned}$$

C标准品：0.05 mmol/L=50 μ mol/L；V标准品：100 μ L=1 \times 10 $^{-4}$ L；稀释倍数：V反总 \div V上清液=(50+850+50+50+175+175) \div 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，10 μ L=0.01mL；T：催化反应时间(min)，30min。

b.使用96孔板测定的计算公式如下

(1).按照蛋白浓度计算：

活性单位定义：37 $^{\circ}$ C下，每分钟每毫克蛋白催化产生1nmol甲醛为1个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{ERND活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= C_{\text{标准品}} \times V_{\text{标准品}} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div A_{\text{标准管}} \times \text{稀释倍数} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 45 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div A_{\text{标准管}} \div C_{\text{pr}}.\end{aligned}$$

(2).按照样本质量计算：

活性单位定义：37 $^{\circ}$ C下，每分钟每克样品催化产生1nmol甲醛为1个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{ERND活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= C_{\text{标准品}} \times V_{\text{标准品}} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div A_{\text{标准管}} \times \text{稀释倍数} \div (W \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 45 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}) \div A_{\text{标准管}} \div W\end{aligned}$$

C标准品：0.05 mmol/L=50 μ mol/L；V标准品：100 μ L=1 \times 10 $^{-4}$ L；稀释倍数：V反总 \div V上清液=(50+850+50+50+175+175) \div 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，10 μ L=0.01mL；T：催化反应时间(min)，30min。

