

使用说明书

Instruction Manual

细胞色素 b5 检测试剂盒（微量法）

CYB5 Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

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。

检测原理

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。

产品组成及储存条件

100T/96S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0062M-A	粉剂×2 瓶	4℃保存。临用前各加 100mL 蒸馏水，充分溶解。
CB0062M-B	液体×1 瓶	4℃保存。
CB0062M-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 CB0062M-C 瓶盖，加 CB0062M-B 20mL 充分溶解，4℃避光可保存 1 周。	

注：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、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。

二、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 1mL 4℃预冷的 CB0062M-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 1mL CB0062M-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 CB0062M-B 0.5mL，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。

三、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：

试剂名称	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, 测量 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。ΔA 空白管= A 空白管 1- A 空白管 2。ΔA 测定管= A 测定管 1- A 测定管 2。

注: 只需要做一个空白管。

四、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

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

2. 按样本鲜重计算

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

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)。

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 按蛋白浓度计算

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

2. 按样本质量计算

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

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)。

注意事项

1. 蛋白定量测定, 建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
2. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
3. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

