

使用说明书

Instruction Manual

细胞色素 b5 检测试剂盒（可见分光光度法）

CYB5 Assay Kit (Visible Spectrophotometry)

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

50T/48S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0062V-A	粉剂×1 瓶	4℃保存。临用前各加 100mL 蒸馏水，充分溶解。
CB0062V-B	液体×1 瓶	4℃保存。
CB0062V-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 CB0062V-C 瓶盖，加 CB0062V-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、1mL 玻璃比色皿和蒸馏水、普通离心机，超速离心机、可调式移液枪。

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 1 mL 4℃预冷的 CB0062V-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 CB0062V-A，盖紧后充分震荡溶解，100000g 离心 30min，弃上清液。
4. 最终微粒体：向步骤 3 的沉淀中加 0.5mL CB0062V-B，盖紧后充分震荡溶解，即待测液，该待测液需当天测定。

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. 取玻璃比色皿依次加入下列试剂：

试剂名称	空白管 (μL)	测定管 (μL)
蒸馏水	50	
待测液		50
工作液	1000	1000

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：

1. 按蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{CYB5 含量 (nmol/mg prot)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \\ &= 123 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

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， 171×10^{-6} L/nmol/cm；d：比色皿光径（cm），1cm；V 反总：反应体系总体积，1.05mL=0.00105L；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，50μL=0.05mL；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。

