

使用说明书

Instruction Manual

红霉素-N-脱甲基酶活性检测试剂盒（微量法）

ERND Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

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。红霉素-N-脱甲基酶（Erythromycin N-demethylase, 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。

检测原理

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。

产品组成及储存条件

100T/48S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0069M-A	粉剂×1 瓶	4℃保存；临用前加 100mL 蒸馏水充分溶解。
CB0069M-B	液体×1 瓶	4℃保存。
CB0069M-C	粉剂×1 瓶	4℃保存；临用前加入 1mL 蒸馏水，充分溶解。
CB0069M-D	粉剂×1 瓶	4℃保存；临用前加入 0.5mL 蒸馏水，充分溶解。
CB0069M-E	粉剂×1 瓶	4℃保存；临用前加蒸馏水 4.5mL 充分溶解。
CB0069M-F	液体×1 瓶	4℃保存。
CB0069M-G	液体×1 瓶	4℃保存。
CB0069M-S	液体×1 瓶	-20℃保存。临用前取 CB0069M-S 10μL+ 990μL 蒸馏水，混匀即为 0.05mmol/L 标准甲醛溶液，4℃保存。

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、微量石英比色皿/96 孔板、普通离心机，超速离心机、可调式移液枪、蒸馏水和冰。

二、粗酶液提取：

- 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 CB0069M-A，冰上充分研磨，10 000g 4℃离心 30min，取上清液转入超速离心管。
- 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 1mL CB0069M-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 CB0069M-B 0.5mL，盖紧后充分震荡溶解，4℃保存待测。
- 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 30min，调节波长到 412nm，蒸馏水调零。
2. CB0069M-B 在 37℃水浴中预热 30min。
3. 取 1.5mL EP 管依次加入下列试剂：

试剂名称	对照管 (μL)	测定管 (μL)	标准管 (μL)
粗酶液	10	250	
CB0069M-B	170	170	
CB0069M-C	10	10	
CB0069M-D		10	
蒸馏水	10		
混匀后 37℃水浴中保温 30min；立即加入。			
CB0069M-E	35	35	
混匀后置于冰浴中 5min；取出后加入。			
CB0069M-F	35	35	
混匀后室温静置 5min；室温 8000rpm 离心 5min；取上清液加入新的 1.5mL EP 管。			
上清液	100	100	
标准品			100
CB0069M-G	100	100	100
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、A 测定管、A 标准管。			

注：每个样品都需要做对照管。

四、ERND 活性计算公式：

1. 按蛋白浓度计算

活性单位定义：37℃下，每分钟每毫克蛋白催化产生 1nmol 甲醛为 1 个酶活单位。

ERND 活性 (nmol/min/mg prot)

= C 标准品×V 标准品×(A 测定管-A 对照管)÷A 标准管×稀释倍数÷(Cpr×V 样)÷T

= 45×(A 测定管-A 对照管)÷A 标准管÷Cpr

2. 按样本鲜重计算

活性单位定义：37℃下，每分钟每克样品催化产生 1nmol 甲醛为 1 个酶活单位。

ERND 活性(nmol/min/g 鲜重)

= C 标准品×V 标准品×(A 测定管-A 对照管)÷A 标准管×稀释倍数÷(W×V 样)÷T

= 45×(A 测定管-A 对照管)÷A 标准管÷W

注：C 标准品：0.05mmol/L=50μmol/L；V 标准品：100μL=1×10⁻⁴ L；稀释倍数：V 反总÷V 上清液=(50+850

+50+50+175+175)÷500=2.7；Cpr：粗酶液蛋白质浓度 (mg/mL)，需要另外测定；W：样品质量，g；V 样：加入

粗酶液体积，10μL=0.01mL；T：催化反应时间 (min)，30min。

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。

