

NADPH-细胞色素C还原酶（NCR）活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1235

产品规格：100管/96样

产品简介：

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。

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。

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。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体×1瓶	4℃
试剂二	液体×1瓶	4℃
试剂三	粉剂×1管	-20℃
试剂四	粉剂×1管	4℃

溶液的配制：

1. 试剂三：临用前配制，加1.04mL蒸馏水充分溶解，4℃保存。
2. 试剂四：临用前配制，加1100μL蒸馏水充分溶解，4℃保存。

需自备的仪器和用品：

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。

操作步骤：

一、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1mL试剂一，冰上充分研磨，10000g 4℃离心30min，取上清液，转移到超速离心管中。
2. 粗制微粒体：4℃，100000g，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，100000g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，盖紧后充分震荡溶解，4℃保存待测。

二、NADPH-细胞色素C还原酶测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热30min，调节波长到550nm，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。

三、NCR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



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

活性单位定义：37℃中，每毫克蛋白每分钟催化产生1μmol还原型细胞色素C为1个酶活单位。

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

(2) 按样本质量计算

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

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

ε：还原型细胞色素C摩尔消光系数，19100L/mol/cm=0.0191L/μmol/cm；d：比色皿光径（cm），1cm；V反总：反应体系总体积（L），210μL=2.1×10⁻⁴L；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），10μL=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℃中，每毫克蛋白每分钟催化产生1μmol还原型细胞色素C为1个酶活单位。

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

(2) 按样本质量计算

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

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

ε：还原型细胞色素C摩尔消光系数，19100L/mol/cm=0.0191L/μmol/cm；d：96孔板光径（cm），0.5cm；V反总：反应体系总体积（L），210μL=2.1×10⁻⁴L；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），10μL=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℃可保存两天。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>