

细胞色素b5（Cytochrome b5）含量测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

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。

测定原理：

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。

自备仪器和样品：

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、微量玻璃比色皿/96孔板、和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：粉剂×2瓶，4℃保存。临用前各加100mL蒸馏水，充分溶解。

试剂二：液体×1瓶，4℃保存。

试剂三：粉剂×1瓶，4℃保存。

工作液配制：临用前配制，戴一次性手套，小心打开试剂三瓶盖，加试剂二20mL充分溶解，4℃避光可保存1周。

样品中细胞色素b5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、**待测液：**向步骤3的沉淀中加试剂二0.5mL，盖紧后充分震荡溶解，即待测液，该待测液需当天测定。

细胞色素b5含量测定操作：

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. **空白管：**取1mL玻璃比色皿，加入10 μL蒸馏水，200μL工作液，室温静置2 min，424nm和490nm处吸光值，424nm处吸光值记为A空白管1，490nm处吸光值记为A空白管2。△A空白管= A空白管1- A空白管2

4. **测定管：**取1mL玻璃比色皿，加入10 μL待测液，200μL工作液，室温静置2 min，424nm和490nm处吸光值，424nm处吸光值记为A测定管1，490nm处吸光值记为A测定管2。

△A测定管= A测定管1- A测定管2。

细胞色素b5（Cytochrome b5）含量测定试剂盒说明书注意：只需要做一个空白管。

样品细胞色素b5含量计算公式：

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

$$\begin{aligned}\text{细胞色素b5含量}(\text{nmol/mg prot}) &= (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \\ &= 122.8 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

$$\begin{aligned}\text{细胞色素b5含量}(\text{nmol/g 鲜重}) &= (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times (V_{\text{样总}} \div V_{\text{样}}) \div W \\ &= 61.4 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W\end{aligned}$$

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; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $210 \mu\text{L} = 2.1 \times 10^{-4}$ L; C_{pr} : 待测液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中待测液体积, $10 \mu\text{L} = 0.01$ mL; $V_{\text{样总}}$: 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

$$\begin{aligned}\text{细胞色素b5含量}(\text{nmol/mg prot}) &= (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \\ &= 245.6 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

$$\begin{aligned}\text{细胞色素b5含量}(\text{nmol/g 鲜重}) &= (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times (V_{\text{样总}} \div V_{\text{样}}) \div W \\ &= 122.8 \times (\Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}}) \div W\end{aligned}$$

ϵ : 还原型细胞色素b5纳摩尔消光系数, 171×10^{-6} L/nmol/cm; d : 96孔板光径 (cm), 0.5cm; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $210 \mu\text{L} = 2.1 \times 10^{-4}$ L; C_{pr} : 待测液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中待测液体积, $10 \mu\text{L} = 0.01$ mL; $V_{\text{样总}}$: 待测液总体积, 0.5 mL; W : 样品质量 (g)。