

NADPH-细胞色素 C 还原酶 (NCR) 检测试剂盒 (微量法)

货号：PMK1206

保存：-20℃避光保存 6 个月

规格：48T/96T

适用样本：动物组织

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。本试剂盒为检测样本中的 NCR 酶活性提供了一种方便的工具。其原理是 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。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48 T	96 T	
试剂一	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	4℃保存
试剂二	35mL	70mL	4℃保存
试剂三	粉剂×1 支	粉剂×1 支	-20℃避光保存
试剂四	粉剂×1 支	粉剂×1 支	-20℃保存

自备耗材

酶标仪或可见分光光度计（能测 550nm 处的吸光度）及水浴锅或恒温培养箱

96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头

低温离心机、超速离心机、制冰机

匀浆器或研钵

去离子水

试剂准备

试剂一：临用前每瓶加 100mL 去离子水充分溶解。溶解后的试剂可 4℃保存一周，也可分装-20℃长期保存，避免反复冻融。

试剂二：即用型；使用前，平衡到室温；保存于 4℃。

试剂三：临用前配制，48T 加入 0.52mL 去离子水，96T 加入 1.04mL 去离子水充分溶解，溶解后的试剂分装-20℃保存，避免反复冻融。

试剂四：临用前配制，48T 加入 0.55mL 去离子水，96T 加入 1.1mL 去离子水充分溶解，溶解后的试剂分装-20℃保存，避免反复冻融。

样本制备

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，10 000g 4℃离心 30min，取上清液，转移到超速离心管中。

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 试剂一，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 的沉淀中加试剂二 0.5mL，盖紧后充分震荡溶解，即待测液，置冰上代测，该待测液需当天测定。

产品说明书

注意：建议使用新鲜样本。如果不立即使用，可将样品在-80℃下保存一个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用BCA蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或可见分光光度计预热 30min，调节波长到 550nm，可见分光光度计去离子水调零。
2. 试剂二在 37℃水浴中预热 30min。
3. 空白管：在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入 10 μL 去离子水、180 μL 试剂二、10 μL 试剂三和 10 μL 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。 $\Delta A_{\text{空白}}=A_2-A_1$ 。
4. 测定管：在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入 10 μL 样本待测液、180 μL 试剂二、10 μL 试剂三和 10 μL 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。 $\Delta A_{\text{测定}}=A_4-A_3$ 。

注意：只需要做一个空白。

实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验，如果 $\Delta A_{\text{测定}}$ 大于 1.0，样本可用试剂二进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数；如果 $\Delta A_{\text{测定}}$ 小于 0.001，可增加样本量进行检测。

结果计算

A. 使用 96 孔板测定的计算公式

(1) 按蛋白浓度计算

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

$$\text{NCR (U/mg prot)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 1.1 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算

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

$$\text{NCR ((U/g 鲜重))} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 0.55 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W$$

$V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积，210 μL = 2.1×10^4 L； ϵ ：还原型细胞色素 C 摩尔消光系数，19100 L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.5cm； 10^6 ：1mol = 1×10^6 μmol；Cpr：待测液蛋白质浓度，mg/mL； $V_{\text{样}}$ ：加入反应体系中待测液体积，10 μL = 0.01mL；T：反应时间，2min $V_{\text{样总}}$ ：待测液总体积，0.5mL；W：样品质量，g。

B. 使用微量比色皿测定的计算公式

将上述计算公式中的光径 d：0.5cm 调整为 d：1cm 进行计算即可。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1210 细胞色素 b5 检测试剂盒（微量法）

PMK1102 线粒体呼吸链复合体 III/CoQ-细胞色素 C 还原酶检测试剂盒（微量法）

PMK1103 线粒体呼吸链复合体 IV/细胞色素 C 氧化酶检测试剂盒（微量法）



更多产品详情了解，请关注公众号：