

细胞色素 b5 检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1210

保存：4℃避光保存 12 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。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。本试剂盒为检测样本中的细胞色素 P450 提供了一种方便的工具。其原理是氧化型细胞色素 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	38mL	76mL	4℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	4℃保存

自备耗材

酶标仪或可见分光光度计（能测 424nm 和 490nm 处的吸光度）及水浴锅

96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头

离心机

去离子水

匀浆器或研钵

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℃。

工作液：临用前配制，戴一次性手套，小心打开试剂三瓶盖，每瓶试剂三加试剂二 10mL 充分溶解。溶解后的试剂可 4℃避光保存一周，也可分装-20℃长期保存，避免反复冻融。

样本制备

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，冰浴匀浆，10,000g 4℃离心 30min，取上清液，转入超速离心管中。
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. 待测液制备：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。

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。

产品说明书

实验步骤

1. 酶标仪或可见分光光度计预热 30min。
2. 工作液置于 25℃水浴中预热 30min。
3. 测定：

空白管：在 96 孔板或微量玻璃比色皿中加入 10 μL 去离子水，200 μL 工作液，室温静置 2min，测定 424nm 和 490nm 处吸光值，424nm 处吸光值记为 $A_{\text{空白1}}$ ，490nm 处吸光值记为 $A_{\text{空白2}}$ 。 $\Delta A_{\text{空白}} = A_{\text{空白1}} - A_{\text{空白2}}$ 。

测定管：在 96 孔板或微量玻璃比色皿中加入 10 μL 待测液，200 μL 工作液，室温静置 2min，测定 424nm 和 490nm 处吸光值，424nm 处吸光值记为 $A_{\text{测定1}}$ ，490nm 处吸光值记为 $A_{\text{测定2}}$ 。 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定1}} - A_{\text{测定2}}$ 。

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

细胞色素 b5 含量 (nmol/mg prot) = $[(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d)] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) = 245.6 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}$

(2) 按样本质量计算

细胞色素 b5 含量 (nmol/g 鲜重) = $[(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d)] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) = 122.8 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W$

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，0.5cm； $V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积，210 μL = 2.1×10^{-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 μL = 0.01 mL； $V_{\text{样总}}$ ：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：

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：

