

细胞色素 b5 (Cytochrome b5) 含量检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC2765

规格：100T/96S

产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	粉剂×2 瓶	4℃保存
试剂二	液体 75mL×1 瓶	4℃保存
试剂三	粉剂×2 瓶	4℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂一：临用前取一瓶加入 100mL 蒸馏水，充分溶解；用不完的试剂 4℃可保存 4 周；
- 2、工作液配制：临用前取一瓶试剂三，戴一次性手套，小心打开试剂三瓶盖，缓慢加入 12mL 试剂二，充分溶解，4℃避光可保存 1 周。

产品说明：

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。

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。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、超速离心机、恒温培养箱、研钵/匀浆器、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本提取（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

- 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 0.5mL 试剂二，盖紧后充分震荡溶解，即待测液，置于冰上待测。

二、测定步骤

- 1、可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 424nm 和 490nm，分光光度计用蒸馏水调零。
- 2、**空白管：**取微量玻璃比色皿/96 孔板，依次加入 10μL 蒸馏水、200μL 工作液，室温静置 2min，分别测定 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。计算 ΔA 空白管 = A 空白管 1 - A 空白管 2。**注：空白管只需做 1-2 次。**

3、**测定管**：取微量玻璃比色皿/96孔板，依次加入 10 μ L 待测液、200 μ L 工作液，室温静置 2min，分别测定 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。计算 ΔA 测定管=A 测定管 1-A 测定管 2。

三、细胞色素 b5 含量计算

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

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

(2) 按样本质量计算

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

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 反总：反应体系总体积，210 μ L =0.21mL； Cpr ：待测液蛋白质浓度 (mg/mL)，**需要另外测定**； V 样：加入反应体系中待测液体积，10 μ L=0.01 mL； V 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

将上述计算公式中比色皿光径 $d=1\text{cm}$ 改为 $d=0.5\text{cm}$ 。

注意事项：

- 1、如果测定吸光值 $A>1.5$ 或 $\Delta A>1$ ，建议稀释样本后再测定，计算公式中乘以稀释倍数。
- 2、如果测定吸光值较低或接近空白 OD 值，建议增加样本量后再进行测定，注意同步修改计算公式。