

细胞色素 b5 (Cytochrome b5) 含量测定试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

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：

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。

自备仪器和用品：

可见分光光度计、普通离心机，**超速**离心机、可调式移液枪、1mL 玻璃比色皿和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：粉剂×1 瓶，4℃保存。临用前加 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 50 mL 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：**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 **50 μL 蒸馏水**，1000μL 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。ΔA 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 **50 μL 待测液**，1000μL 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。 ΔA 测定管= A 测定管 1- A

测定管 2。

注意：只需要做一个空白管。

样品细胞色素 b5 含量计算公式：

(1).按照蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned}\text{细胞色素 b5 含量(nmol/mg prot)} &= (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \epsilon \div d \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \\ &= 123 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

(2).按照样本质量计算：

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

ϵ ：还原型细胞色素 b5 纳摩尔消光系数， $171 \times 10^6 \text{ L/nmol/cm}$ ；d：比色皿光径 (cm)，1cm；V 反总：反应体系总体积，1.05 mL=0.00105 L；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，50 μL =0.05 mL；V 样总：待测液总体积，0.5 mL；W：样品质量，g。