

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K808-M

产品规格: 48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器: 酶标仪(430-470 nm)

Elabscience®细胞色素 P450 还原酶(CPR)

比色法测试盒

Cytochrome P450 Reductase(CPR) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测组织和细胞样本中的细胞色素 P450 还原酶 (CPR) 的酶活。

检测原理

细胞色素 P450 还原酶 (CPR) 是细胞色素 P450 (CYPs) 系统中的重要组成部分。CPR 从电子供体获得电子后, 将电子传递给 CYPs 使得 CYPs 与氧化型底物及分子反应, 生成还原型底物和水。

本试剂盒利用 CPR 传递电子的特点, 使其催化底物生成显色物质, 该显色物质在 450 nm 处有最大吸收, 检测单位时间内显色物质在 450 nm 处的 OD 值, 即可计算 CPR 的酶活。

本试剂盒检测组织和细胞样本时, 需测定总蛋白浓度, 动物组织样本和细胞样本推荐使用 BCA 法 (货号: E-BC-K318-M); 植物组织样本推荐使用考马斯亮蓝法 (货号: E-BC-K168-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	对照液 (Control Solution)	3.5 mL×1 瓶	7 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	酶稀释液 (Enzyme Diluent)	12.5 mL×1 瓶	25 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 (Substrate)	粉剂×2 支	粉剂×4 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	标准品 (Standard)	粉剂×2 支	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板		
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明: 试剂严格按上表中的保存条件保存, 不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂, 使用前请先离心, 以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(波长 430-470 nm, 最佳检测波长 450 nm)、37 ℃ 恒温培养箱

试剂：生理盐水 (0.9% NaCl)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂三工作液的配制：

取一支试剂三，用6 mL试剂二溶解混匀，未使用完的试剂2-8 ℃避光可保存3天。

③ 1 mmol/L标准品的配制：

取一支试剂四，用5 mL双蒸水溶解混匀，得到1 mmol/L标准品溶液，未使用完的试剂-20 ℃可保存7天。

④ 500 μmol/L标准品的配制：

按1 mmol/L标准品溶液：双蒸水=1：1体积比配制，未使用完的试剂-20 ℃可保存3天。

⑤ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度 (μmol/L)	0	100	200	250	300	350	400	500
500 μmol/L 标准品 (μL)	0	40	80	100	120	140	160	200
双蒸水 (μL)	200	160	120	100	80	60	40	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：按照组织样本质量 (g) : 生理盐水 (0.9% NaCl) 体积 (mL) =1: 9的比例匀浆, 4°C, 10000 ×g离心10 min, 取上清液, 置于冰上待测, 当天检测有效。留取部分上清, 进行蛋白浓度测定。

细胞样本：取 1×10^6 个细胞, 加入200 μ L生理盐水 (0.9% NaCl) 匀浆, 4°C, 10000 ×g离心10 min, 取上清液, 置于冰上待测, 当天检测有效。留取部分上清, 进行蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前, 需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验, 根据预实验的结果, 结合本试剂盒的线性范围: 9.11-550 U/L, 请参考下表稀释(仅供参考):

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠肝脏组织	不稀释	10%小鼠肺组织	不稀释
10%小鼠肾组织	不稀释	10%小鼠心脏组织	不稀释
1×10^6 个 CHO 细胞	不稀释	1×10^6 个 Jurkat 细胞	不稀释
1×10^6 个 293T 细胞	不稀释	0.375×10^6 个 A549 细胞	不稀释
0.35×10^6 个 HeLa 细胞	不稀释	0.5×10^6 个 Molt-4 细胞	不稀释

注：稀释液为生理盐水 (0.9% NaCl) 。

操作步骤

- ① 标准孔:取 20 μL 不同浓度的标准品溶液,分别加入相应的酶标孔中。
测定孔:取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
对照孔:取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①中标准孔加入 200 μL 试剂一。
- ③ 向步骤①中测定孔加入 200 μL 试剂三工作液。
- ④ 向步骤①中对照孔加入 200 μL 双蒸水。
- ⑤ 振板 5 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 10 min, 使用酶标仪于 450 nm 检测各孔的 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔	对照孔
不同浓度标准品溶液(μL)	20	--	--
待测样本(μL)	--	20	20
试剂一(μL)	200	--	--
试剂三工作液(μL)	--	200	--
双蒸水(μL)	--	--	200
振板 5 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 10 min, 使用酶标仪于 450 nm 测定各孔的 OD 值			

预实验样本对照孔 OD 值小于 0.05, 正式实验可不设对照孔; 本试剂盒检测组织和细胞样本时, 需测定总蛋白浓度, 动物组织样本和细胞样本推荐使用 BCA 法 (货号: E-BC-K318-M); 植物组织样本推荐使用考马斯亮蓝法 (货号: E-BC-K168-M)。

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

组织和细胞样本中细胞色素 P450 还原酶 (CPR) 酶活计算公式：

酶活定义：37℃ 条件下，每克组织或细胞蛋白在反应体系中每分钟消耗 1 μmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{CPR 活力 (U/gprot)} = (\Delta A - b) \div a \div C_{\text{pr}} \times f \div T$$

注解：

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔA : 样本测定孔 OD 值-样本对照孔 OD 值

C_{pr} : 匀浆后待测样本的蛋白浓度, gprot/L

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

T: 反应时间, 10 min

附录1 关键数据

1. 技术参数

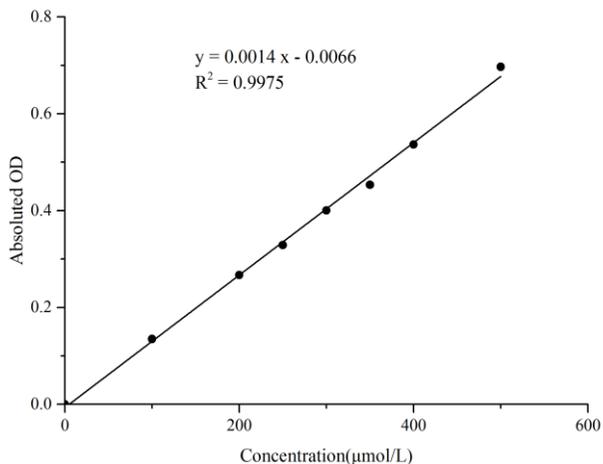
检测范围	9.11-550 U/L	批间差	3.2-3.9 %
检测灵敏度	9.11 U/L	批内差	2.8-3.8 %
稀释回收率	98-100 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度标准品加样量20 μL ，按照操作步骤进行实验，OD值如下表所示：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	100	200	250	300	350	400	500
OD 值	0.165	0.305	0.438	0.497	0.571	0.615	0.676	0.868
	0.167	0.297	0.428	0.493	0.562	0.624	0.729	0.858
平均 OD 值	0.166	0.301	0.433	0.495	0.567	0.620	0.703	0.863
绝对 OD 值	0	0.135	0.267	0.329	0.401	0.454	0.537	0.697

②绘制标曲(如下图)：



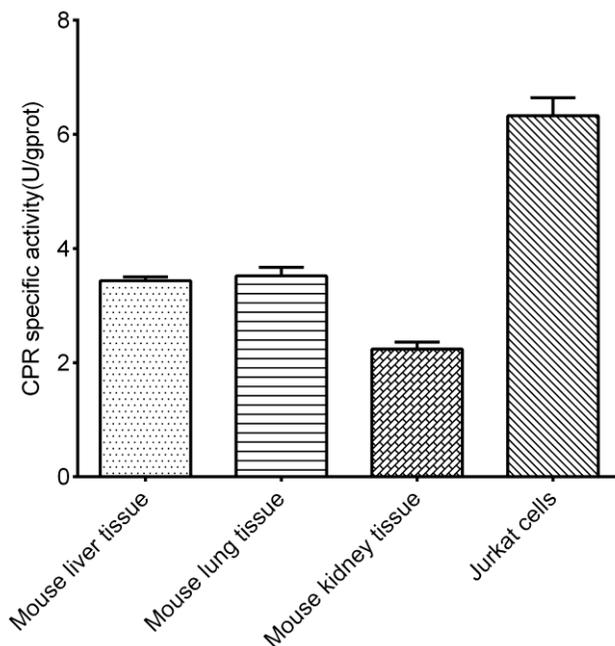
附录2 实例分析

例如检测小鼠肝组织(数据仅供参考):

取10%小鼠肝组织匀浆上清液20 μL , 按操作表操作, 结果如下: 标准曲线: $y = 0.0014x - 0.0066$, 测定孔平均OD值为0.550, 对照孔平均OD值为0.167, 10%小鼠肝组织匀浆蛋白浓度为8.09 gprot/L, 计算结果为:

$$\text{CPR活力(U/gprot)} = (0.550 - 0.167 + 0.0066) \div 0.0014 \div 8.09 \div 10 = 3.44 \text{ U/gprot}$$

按说明书操作, 测定小鼠肝组织(10%组织匀浆蛋白浓度8.09 gprot/L, 加样量20 μL)、小鼠肺组织(10%组织匀浆蛋白浓度6.90 gprot/L, 加样量20 μL)、小鼠肾组织(10%组织匀浆蛋白浓度1.40 gprot/L, 加样量20 μL)、 1×10^6 个Jurkat细胞(1×10^6 个细胞匀浆蛋白浓度0.39 gprot/L, 加样量20 μL)中的CPR活力(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本测不出值	样本不新鲜	取新鲜样本，重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

