

(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-F023

产品规格: 48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器: 荧光酶标仪(激发波长 390 nm, 发射波长 468 nm)

Elabscience®细胞色素 P450 2D6 酶 (CYP2D6)

荧光法测试盒

Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) Activity

Fluorometric 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肝微粒体样本中的细胞色素 P450 2D6 酶(CYP2D6)的活力。

检测原理

细胞色素 P450 2D6 酶 (Cytochrome P450 2D6, CYP2D6) 是细胞色素 P450 酶家族的一员, 负责代谢人体内大约 25% 的药物, 主要在肝脏中表达。CYP2D6 对许多临床上重要的药物具有显著的代谢作用, 包括抗抑郁药、抗精神病药、 β -阻滞剂和止痛药等。它通过氧化反应将这些药物转化为更易排泄的代谢产物。CYP2D6 在药物代谢中的关键作用和个体差异的显著影响, 使得检测该酶的活性对于个体化医疗具有重要意义。

本试剂盒检测原理: 底物经过 CYP2D6 催化后转化荧光物质, 在激发波长 390 nm, 发射波长 468 nm 处检测荧光值, 通过标准品荧光值计算酶活。

本试剂盒检测肝微粒体样本时, 需测定总蛋白浓度, 推荐使用 BCA 法 (货号: E-BC-K318-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)	缓冲液 (Buffer Solution)	50 mL×1 瓶	50 mL×2 瓶	-20°C 避光保 存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	提取液 (Extraction Solution)	50 mL×1 瓶	50 mL×2 瓶	-20°C 避光保 存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	稀释液 (Diluent Solution)	50 mL×1 瓶	50 mL×2 瓶	-20°C 避光保 存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 (Substrate)	0.02 mL×2 支	0.02 mL×4 支	-20°C 避光保 存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	还原剂 (Reducing Reagent)	0.5 mL×1 支	1 mL×1 支	-20°C 避光保 存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	0.25 mL×1 支	0.5 mL×1 支	-20°C 避光保 存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	5 mmol/L 标准品溶液 (5 mmol/L Standard Solution)	0.5 mL×1 支	1 mL×1 支	-20°C 避光保 存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	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，不同试剂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：荧光酶标仪(激发波长 390 nm，发射波长 468 nm)、37 °C 恒温箱

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温(25℃)。

② 底物工作液的配制：

取一支试剂四离心(25℃, 500 g, 3 min)，加入1 mL试剂一混匀，按需配制，现配现用，避光待用，当天使用有效。

③ 测定工作液的配制：

将试剂一：试剂五：试剂六按体积比=44：5：1配制，按需配制，现配现用，避光待用，当天使用有效。

④ 200 μmol/L标准品的配制：

将试剂七：试剂一按体积比=1：24配制，按需配制，现配现用，避光待用，当天使用有效。

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	40	60	80	120	140	160	200
200 μmol/L 标准品(μL)	0	40	60	80	120	140	160	200
试剂一(μL)	200	160	140	120	80	60	40	0

样本准备

① 样本处理

肝微粒体提取：称取0.05 g的肝组织加入0.45 mL试剂二匀浆处理，4°C，7800 ×g，离心20 min，取上清。4°C，21000 ×g，离心45 min，弃上清，向沉淀物中加入0.9 mL试剂三上下吹打，混匀，制备成10%肝微粒体悬液样本。留取部分肝微粒体悬液样本进行蛋白浓度测定。

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：0.29-4.42 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数
10%小鼠肝微粒体	不稀释

注：稀释液为试剂三。

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。
- ② 向步骤①中各孔加入 30 μL 底物工作液。
- ③ 向步骤②中各孔加入 50 μL 测定工作液。
- ④ 振板 5 s, 荧光酶标仪设置激发波长 390 nm, 发射波长 468 nm, 立即检测测定孔荧光值, 记为 F_1 。
- ⑤ 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 45 min, 相同波长条件下检测各孔荧光值, 记为 F_2 。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度的标准品溶液(μL)	20	--
待测样本(μL)	--	20
底物工作液(μL)	30	30
测定工作液(μL)	50	50
振板 5 s, 荧光酶标仪设置激发波长 390 nm, 发射波长 468 nm, 立即检测测定孔荧光值, 记为 F_1 。37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 45 min, 相同波长条件下检测各孔荧光值, 记为 F_2 。		

本试剂盒检测肝微粒体样本时, 需测定总蛋白浓度, 推荐使用 BCA 法 (货号: E-BC-K318-M)。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

肝微粒体样本中细胞色素 P450 2D6 酶(CYP2D6)活力计算公式:

定义: 37℃ 条件下, 每克肝微粒体蛋白每分钟催化底物产生 1 μmol 的产物所需要的酶活为一个活力单位。

$$\text{CYP2D6 活力 (U/gprot)} = (\Delta F - b) \div a \div T \times f \div C_{\text{pr}}$$

注解:

y: 标准品荧光值-空白荧光值(标准品浓度为 0 时的荧光值, 标准曲线以标准孔 F_2 值进行拟合)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔF : 样本测定孔变化荧光值, $F_2 - F_1$

T: 反应时间, 45 min

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr} : 待测样本的蛋白浓度, gprot/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

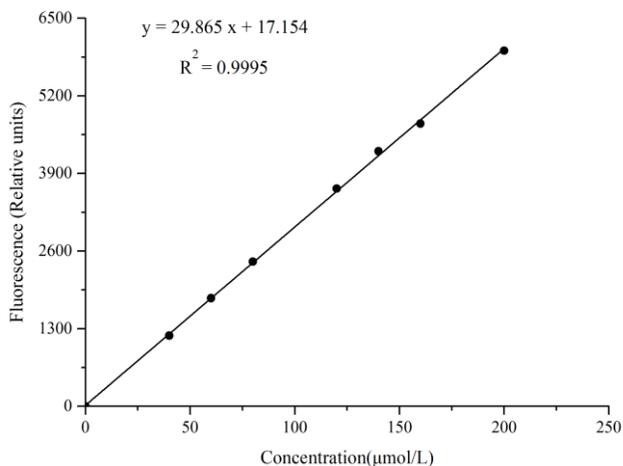
检测范围	0.29-4.42 U/L	批间差	9.0-9.9%
灵敏度	0.29 U/L	批内差	2.1-3.1%
稀释回收率	91-101%		

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，荧光值如下表所示：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	40	60	80	120	140	160	200
荧光值	208	1416	2052	2646	3857	4533	5008	6225
	216	1377	1994	2623	3862	4435	4888	6115
平均荧光值	212	1397	2023	2634	3859	4484	4948	6170
绝对荧光值	0	1184	1811	2422	3647	4272	4735	5958

② 绘制标曲(如下图)：



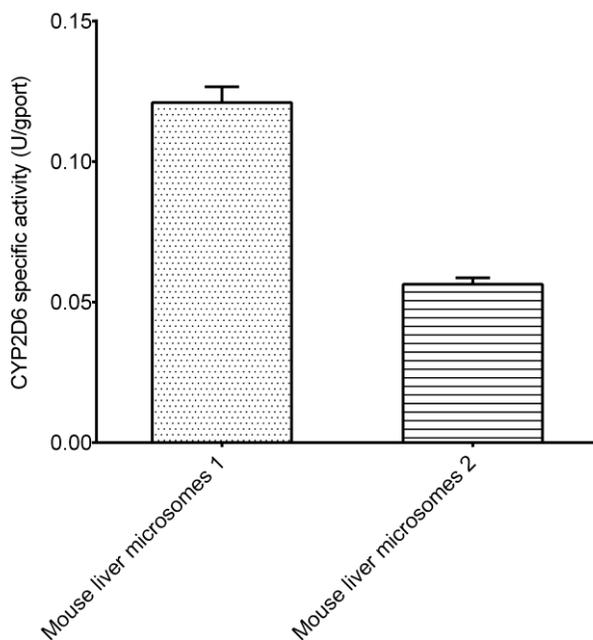
附录2 实例分析

例如小鼠肝微粒体 (数据仅供参考):

取20 μL 10%小鼠肝微粒体样本加入到酶标板孔中, 按操作表操作, 结果如下: 标准曲线为 $y = 29.865x + 17.154$, 测定孔荧光值 F_1 为317, F_2 为1463, $\Delta F = F_2 - F_1 = 1463 - 317 = 1146$, 测定出小鼠肝微粒体悬液样本的蛋白含量为6.94 gprot/L, 计算结果为:

$$\text{CYP2D6活力(U/gprot)} = (1146 - 17.154) \div 29.865 \div 45 \div 6.94 = 0.121 \text{ U/gprot}$$

按说明书操作, 测定小鼠肝微粒体1(蛋白浓度为6.94 gprot/L, 加样量20 μL)、小鼠肝微粒体2(蛋白浓度为14.88 gprot/L, 加样量20 μL)中的CYP2D6活力(如下图):



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。

