

红霉素-N-脱甲基酶 (ERND) 活性测定试剂盒说明书

微量法 100T/48S

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

细胞色素 P450 酶是一组主要存在于肝脏的酶系, 在外源物质代谢中, 尤其是药物和毒物的代谢, 具有重要作用。ERND 在 P450 酶系中相当于 CYP2B 亚型, 与药物代谢的去甲基化密切相关。CYP2B 具有催化底物形成非活性易于排泄的代谢产物而具有解毒作用, 也可使某些药物经 CYP2B 代谢活化。

测定原理:

ERND 催化红霉素释放甲醛, 通过 Nash 比色测定甲醛含量, 即可计算出 ERND 活性。

组成:

产品名称	CP008-100T/48S	Storage
试剂一: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂二: 液体	1 瓶	4°C
试剂三: 粉剂	1 管	4°C
试剂四: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂五: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂六: 液体	1 瓶	4°C
试剂七: 液体	1 瓶	4°C
标准液: 液体	1 瓶	-20°C
说明书	一份	

试剂一: 粉剂×1 瓶, 4°C 保存。临用前加 100ml 蒸馏水溶解。

试剂三: 粉剂×1 管, 4°C 保存。临用前加 1ml 蒸馏水, 充分溶解。

试剂四: 粉剂×1 瓶, 4°C 保存。临用前加 0.5ml 蒸馏水, 充分溶解。

试剂五: 粉剂×1 瓶, 4°C 保存。临用前, 加蒸馏水 4.5ml 充分溶解。

标准液: 液体×1 瓶, -20°C 保存。临用前取 1.5ml EP 管, 加入 10 μ l 标准液, 加 990 μ l 蒸馏水, 混匀即为 0.05 mmol/L 标准甲醛溶液, 4°C 保存。

自备仪器和用品:



普通离心机，超速离心机、可调式移液枪、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板、蒸馏水和冰。

粗酶液提取：

- 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、**最终微粒体：**向步骤 3 的沉淀中加试剂二 0.5ml，充分震荡溶解，即粗酶液，待测。该待测液需当天使用。

测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min，调节波长到 412 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂二置于 37℃水浴中预热 30 min。
3. **对照管：**取 0.5ml EP 管，加入 10 μ l 粗酶液，170 μ l 试剂二，10 μ l 试剂三，10 μ l 蒸馏水，混匀后置于 37℃水浴保温 30min；立即加入 35 μ l 试剂五，混匀后置于冰浴中 5min；取出后加入 35 μ l 试剂六，混匀后室温静置 5min；室温 8000rpm 离心 5min；取新的 EP 管，加入 100 μ l 上清液，100 μ l 试剂七，混匀后 60℃水浴 10min，然后取出，用冷水冷却 5min，于 412nm 测定光吸收，记为 A 对照管。
4. **测定管：**取 0.5ml EP 管，加入 10 μ l 粗酶液，170 μ l 试剂二，10 μ l 试剂三，10 μ l 试剂四，混匀后置于 37℃水浴保温 30min；立即加入 35 μ l 试剂五，混匀后置于冰浴中 5min；取出后加入 35 μ l 试剂六，混匀后室温静置 5min；室温 8000rpm 离心 5min；取新 EP 管，加入 100 μ l 上清液，100 μ l 试剂七，混匀后 60℃水浴 10min，然后取出，用冷水冷却 5min，于 412nm 测定光吸收，记为 A 测定管。
5. **标准管：**取 0.5ml EP 管，加入 100 μ l 标准品，100 μ l 试剂七，混匀后 60℃水浴 10min，然后取出，用冷水冷却 5min，于 412nm 测定光吸收，记为 A 标准管。

注意：每个样品都需要做对照管。

ERND 活性计算公式：

a.使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1). 按照蛋白浓度计算：

活性单位定义：37℃下，每分钟每毫克蛋白催化产生 1nmol 甲醛为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{ERND 活性(nmol/min/mg prot)} &= C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \times \text{稀释倍数} \div (C_{\text{pr}} \times V \\ &\quad \text{样}) \div T \\ &= 45 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \div C_{\text{pr}}. \end{aligned}$$

(2). 按照样本质量计算：

活性单位定义：37℃下，每分钟每克样品催化产生 1nmol 甲醛为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{ERND 活性(nmol/min/g 鲜重)} &= C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \times \text{稀释倍数} \div (W \times V \\ &\quad \text{样}) \div T \\ &= 45 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \div W \end{aligned}$$

C 标准品：0.05 mmol/L=50 μ mol/L；V 标准品：100 μ l=1 \times 10⁻⁴ L；稀释倍数：V 反总 \div V 上清液=(50+850+50+50+175+175) \div 500=2.7；C_{pr}：粗酶液蛋白质浓度 (mg/ml)，需要另外测定，建议使用本公司 BCA

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司

江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号



服务热线：0518-81263339

官网：<http://www.bio149.com>

蛋白质含量测定试剂盒; W: 样品质量, g; V 样: 加入粗酶液体积, $10\mu\text{l}=0.01\text{ml}$; T: 催化反应时间 (min), 30min。

b.使用 96 孔板测定的计算公式如下

(1). 按照蛋白浓度计算:

活性单位定义: 37°C 下, 每分钟每毫克蛋白催化产生 1nmol 甲醛为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{ERND 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \times \text{稀释倍数} \div (Cpr \times V \\ &\quad \text{样}) \div T \\ &= 45 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \div Cpr.\end{aligned}$$

(2). 按照样本质量计算:

活性单位定义: 37°C 下, 每分钟每克样品催化产生 1nmol 甲醛为 1 个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{ERND 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \times \text{稀释倍数} \div (W \times V \\ &\quad \text{样}) \div T \\ &= 45 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div A \text{ 标准管} \div W\end{aligned}$$

C 标准品: $0.05 \text{ mmol}/\text{L}=50\mu\text{mol}/\text{L}$; V 标准品: $100\mu\text{l}=1 \times 10^{-4} \text{ L}$; 稀释倍数: $V \text{ 反总} \div V \text{ 上清液} = (50+850+50+50+175+175) \div 500=2.7$; Cpr: 粗酶液蛋白质浓度 (mg/ml), 需要另外测定, 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒; W: 样品质量, g; V 样: 加入粗酶液体积, $10\mu\text{l}=0.01\text{ml}$; T: 催化反应时间 (min), 30min。

