

细胞色素 P450 (CYP450) 活性测定试剂盒说明书

(货号: GY0934W48 荧光法 48 样)

一、产品简介:

细胞色素 P450 (Cytochrome P450, CYP450) 是一类含血红素的超家族酶。细胞色素 P450 分布极为广泛, 在动物、植物、微生物等各类生物中均有发现, 主要存在于肝脏, 也分布于肠道、肺、肾等组织。在人体中, 肝脏和肠道是其主要分布部位。它参与众多生理过程, 如类固醇激素、类花生酸、维生素 D 和胆汁酸的生物合成, 同时也是许多药物、致癌物、生物碱、农药等外源物质代谢的关键酶。

O-脱乙基反应 (O-Deethylation) 是 CYP450 催化的常见反应之一, CYP450 将底物中的乙氧基 ($-\text{OCH}_2\text{CH}_3$) 移除, 生成相应的酚类或醇类产物。本试剂盒采用 7-乙氧基香豆素 (7-EC) 作为荧光底物, 通过测定其反应产物 7-羟基香豆素 (7-HC) 的荧光变化来确定酶的活性。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 μL ×1 支	4°C保存	低温下易凝固, 临用前解冻至室温 (25°C) 直至呈液体状态 (后续可分装冻存)。
试剂二	粉体 mg×2 支	-20°C保存	临用前每支加入 80 μL 的蒸馏水, 混匀备用 (可分装冻存, 尽量一周内用完)。
试剂三	液体 7.5mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

工作液制备: 临用前按试剂一: 试剂二: 提取液=1:2:97 的比例配制工作液, 现配现用 (配好的工作液在三日内用完)。

三、所需的仪器和用品:

荧光酶标仪、黑色 96 孔板、水浴锅/恒温培养箱、台式离心机、可调式移液器、研钵。

四、细胞色素 P450 (CYP450) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量(g):试剂一体积(mL)为 1:5~10 的比例提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌或细胞数量(10^4 个):提取液体积(mL)为 500~1000:1 的比例提取。

③ 液体样本: 直接检测。若浑浊, 12000rpm, 4°C离心 10min 后取上清检测。

2、上机测定:

① 打开荧光酶标仪, 调节波长。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C)。

③ 在黑色 96 孔板中加入以下试剂:

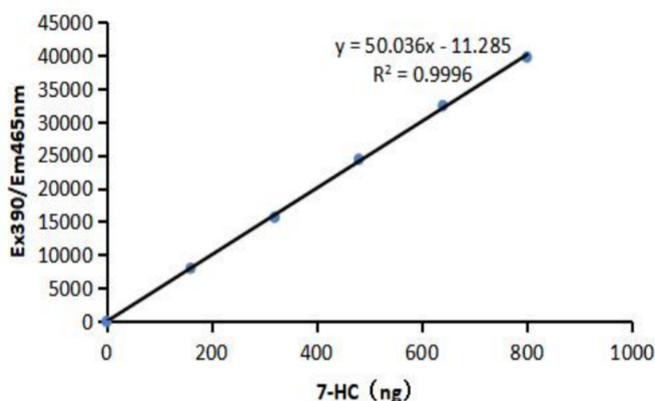
试剂名称 (μL)	测定	空白 (仅做一次)
样本	20	
提取液		20
工作液	80	80
37°C避光孵育 30min		
试剂三	120	120
混匀, 于激发波长 390nm, 发射波长 465nm 处读取荧光值 F。荧光强度=F 测定-F 空白。		

【注】1.若荧光值较大(如超过 4 万), 可对样本用提取液稀释后再检测, 稀释倍数 D 带入公式计算。

2.若荧光值较小(如接近 0), 需增加样本加样量(如由 20μL 增至 40μL, 则试剂三相应减少), 或延长反应时间 T (如由 30min 增至 60min), 或增加取样质量 W, 改变后的样本 V1 和 T 和 W 需重新代入计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 50.036x - 11.285$, x 为标准品质量 (ng); y 是 ΔA 。



2、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每小时催化产生 1ng 的 7-HC 所需的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{CYP450}(\text{ng/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 11.285) \div 50.036] \div (W \times V1 \div V) \div T = 2 \times (\Delta A + 11.285) \div W$$

3、按蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每小时催化产生 1ng 的 7-HC 所需酶量定为一个酶活力单位。

4、按细菌或细胞密度计算:

酶活定义: 每 1 万个细菌或细胞每小时催化产生 1ng 的 7-HC 所需酶量定为一个酶活力单位。

$$\text{CYP450}(\text{ng/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 11.285) \div 50.036] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.004 \times (\Delta A + 11.285)$$

5、按液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体样本每小时催化产生 1ng 的 7-HC 所需酶量定为一个酶活力单位。

$$\text{CYP450}(\text{ng/h/mL}) = [(\Delta A + 11.285) \div 50.036] \div V1 \div T = 2 \times (\Delta A + 11.285)$$

V---提取液体积, 1mL;

V1---反应体系中样本体积, 0.02mL;

T---反应时间, 30min=0.5h;

W---样本质量, g;

500---细胞或细菌总数, 万;

D---稀释倍数, 若未稀释即为 1。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (40μg/mL): 加 1mL 乙醇溶解标准品, 充分混匀, 得到标准品溶液 (2mg/mL), 乙醇稀释 50 倍得到标准品母液 (40μg/mL)。
- 2 把母液稀释成以下浓度: 0, 8, 16, 24, 32, 40μg/mL。也可根据实际来调整浓度。
- 3 在 EP 管中加入: 20μL 标准品+80μL 提取液+120μL 试剂三, 混匀, 于激发波长 390nm, 发射波长 465nm 处读取荧光值 F。依据结果即可制作标准曲线。