

红霉素-N-脱甲基酶（ERND）检测试剂盒（分光光度法）

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：

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。

试剂组成和配制：

试剂一：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加 50 mL 蒸馏水溶解。

试剂二：液体×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加 2.6 mL 蒸馏水，充分溶解。

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前加 2.6 mL 蒸馏水，充分溶解。

试剂五：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。临用前，加蒸馏水 9 mL 充分溶解。

试剂六：液体×1 瓶，4℃ 保存。

试剂七：液体×1 瓶，4℃ 保存。

标准液：液体×1 瓶，-20℃ 保存。临用前取 1.5 mL 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℃ 保存。

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。

测定步骤:

1. 分光光度计预热 30 min 以上, 调节波长到 412 nm, 蒸馏水调零。
2. 试剂二置于 37°C 水浴中预热 30 min。
3. **对照管**: 取 1 支 EP 管, 加入 50 μ L 粗酶液, 850 μ L 试剂二, 50 μ L 试剂三, **50 μ L 蒸馏水**, 混匀后置于 37°C 水浴保温 30min; 立即加入 175 μ L 试剂五, 混匀后置于冰浴中 5min; 取出后加入 175 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 500 μ L 上清液, 500 μ L 试剂七, 混匀后 **60°C 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 1 支 EP 管, 加入 50 μ L 粗酶液, 850 μ L 试剂二, 50 μ L 试剂三, **50 μ L 试剂四**, 混匀后置于 37°C 水浴保温 30min; 立即加入 175 μ L 试剂五, 混匀后置于冰浴中 5min; 取出后加入 175 μ L 试剂六, 混匀后室温静置 5min; 室温 8000rpm 离心 5min; 取 1 支新 EP 管, 加入 500 μ L 上清液, 500 μ L 试剂七, 混匀后 **60°C 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 1 支 EP 管, 加入 500 μ L 标准品, 500 μ L 试剂七, 混匀后 **60°C 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:

- (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。

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

- (2) 按照样本质量计算:

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

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

C 标准品: 0.05 mmol/L=50 μ mol/L;

V 标准品: 500 μ L=0.0005 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 蛋白质含量测定试剂盒;

V 样: 加入粗酶液体积, 50 μ L=0.05mL;

W: 样本质量, g;

T: 催化反应时间, 30min。