

CheKine™ 细胞色素 P450 活性检测试剂盒 (荧光法)

货号: KTB1712

规格: 48 T/48 S

96 T/96 S

批号: 见产品标签

	检测范围: 0.0390625-2.5 nmol/mL		灵敏度: 0.0390625 nmol/mL
	适用样本: 动物组织		
	保质期: -20°C, 避光保存 1 年		

01 背景与原理

细胞色素 P450 酶超家族是一类广泛存在于生物体内的含血红素的单加氧酶, 在药物代谢、外源化合物解毒及内源性物质合成中发挥关键作用。其最显著的特性包括底物广谱性、催化反应多样性 (如羟化、脱烷基、环氧化等) 以及依赖还原型辅酶 II (NADPH) 和分子氧的电子传递链。不同亚型的 P450 酶具有独特的组织分布与底物选择性, 常被用作评估药物相互作用及环境污染物毒性的生物标志物。

在活性检测原理上, 细胞色素 P450 酶具有 7-乙氧基香豆素-O-脱乙基酶 (ECOD) 活性, 能催化底物 7-乙氧基香豆素发生 O-脱乙基反应, 生成高荧光的代谢产物 7-羟基香豆素。通过荧光光度计检测反应体系中 7-羟基香豆素的荧光强度上升, 即可定量反映 CYP450 酶的催化活性。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	70 mL	70 mL×2	4°C
Reagent I	10 mL	20 mL	4°C
Reagent II	5 mL	10 mL	-20°C, 避光保存
Reagent III	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20°C, 避光保存
Reagent IV	10 mL	20 mL	4°C
0.25 mM Standard	500 µL	1 mL	-20°C, 避光保存

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10% 的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	荧光酶标仪	激发波长为 380 nm，发射波长为 450 nm
耗材	96 孔酶标板	全黑板
试剂	去离子水	检测体系配制用
其他	匀浆器（组织样本）、离心机、制冰机、超声破碎仪、 可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有 助于提高实验效率

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 建议实验者自行建立标准曲线以提高结果准确度。如未自行建立标准曲线，可参考结果展示部分的典型标准曲线公式进行结果计算。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃ 保存
Reagent I	即用型；使用前平衡到室温	4℃ 保存
Working Reagent II	临用前配制；使用前将 Reagent II 与 Extraction Buffer 进行 1: 1 混匀	现配现用；冰上避光放置
Working Reagent III	临用前配制；取一支加入 1 mL Extraction Buffer 充分混匀	未用完的试剂分装保存于-20℃分装避 光保存 1 个月，禁止反复冻融
Reagent IV	即用型；使用前平衡到室温	4℃ 保存；样品较多时可使用排枪滴加； Reagent IV 使用前可能会有少量析出 为正常现象，使用前需恢复至室温并摇 匀
0.25 mM Standard	即用型	-20℃避光保存；使用前需振荡混匀

05-1-2 标准品配制

取 10 μL 0.25 mM Standard, 加入 90 μL Extraction Buffer 混匀稀释, 即得 25 nmol/mL Standard, 按下表所示, 进行下一步稀释。每次实验都要做一次标准品检测, 制作标曲; 稀释后的标准品溶液不稳定, 必须在 4 小时内使用。

序号	标准品 (μL)	Extraction Buffer (μL)	浓度 (nmol/mL)
1	50 μL 25 nmol/mL Standard	450	2.5
2	200 μL 2.5 nmol/mL	200	1.25
3	200 μL 1.25 nmol/mL	200	0.625
4	200 μL 0.625 nmol/mL	200	0.3125
5	200 μL 0.3125 nmol/mL	200	0.15625
6	200 μL 0.15625 nmol/mL	200	0.078125
7	200 μL 0.078125 nmol/mL	200	0.0390625
空白	0	200	0

05-2 样本制备

注意: 1. 推荐使用新鲜样本, 样本尽量新鲜提取, 如果不能当天提取, 则把完整细胞或者分装的组织块保存在 -80°C , 一个月内使用。当准备好进行该项实验时, 将样本从 -80°C 拿出后, 冰上解冻。但是请注意, 这可能会影响样本的稳定性, 实验结果可能会低于预期。

2. 肝脏样本中富含的 P450 酶活较高, 可将上清液用 Extraction Buffer 稀释至 20-40 倍后再进行检测。

- 动物组织: 称取约 0.1 g 组织样本, 加入 1 mL Extraction Buffer, 冰浴匀浆, 10000 g, 4°C 离心 10 min, 取上清液待测。

05-3 实验步骤

1. 酶标仪准备: 预热 30 min 以上, 调节激发波长为 380 nm, 发射波长为 450 nm。

2. Working Reagent: 将 Working Reagent III 与 Extraction Buffer 进行 1: 4 混匀, 现用现配。

3. 工作液的配制:

标品工作液: 每个标准孔/空白孔准备 100 μL , 现配现用: 吸取 90 μL Reagent I, 10 μL Working Reagent II, 配制好的工作液需避光放置, 使用前需混匀。

测定工作液: 每个测定孔准备 100 μL 测定工作液, 现配现用: 吸取 80 μL Reagent I, 10 μL Working Reagent II, 10 μL Working Reagent, 配制好的工作液需避光放置, 使用前需混匀。

对照工作液: 每个对照孔准备 100 μL 对照工作液, 现配现用: 吸取 80 μL Reagent I, 10 μL 去离子水, 10 μL Working Reagent, 配制好的工作液需避光放置, 使用前需混匀。

4. 检测体系配制：每个测定孔需设一个对照孔，空白孔和标准孔只用测 1 次。实验操作需要在避光环境下进行。在全黑 96 孔板中按照如下方式操作：

试剂	测定孔 (μL)	对照孔 (μL)	空白孔 (μL)	标准孔 (μL)
样本	20	0	0	0
Standard	0	0	0	20
Extraction Buffer	0	0	20	0
标品工作液	0	0	100	100
测定工作液	100	0	0	0
对照工作液	0	100	0	0
充分混匀，37℃下避光反应 10 min				
Reagent IV	50	50	50	50
样本	0	20	0	0

5. 荧光检测：混匀后，记录各孔的荧光值 RFU，荧光激发波长 380 nm，荧光发射波长 450 nm，测定孔记为 RFU_{测定}，对照孔记为 RFU_{对照}，空白孔记为 RFU_{空白}，标准孔记为 RFU_{标准}。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn) > 进入“技术中心”> 查找“在线计算器”工具。



06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算 $\Delta RFU_{测定} = RFU_{测定} - RFU_{对照}$ ， $\Delta RFU_{标准} = RFU_{标准} - RFU_{空白}$ 。

2. 标准曲线绘制

以标准溶液浓度为 y 轴， $\Delta RFU_{标准}$ 为 x 轴，绘制标准曲线，得到标准方程，将 $\Delta RFU_{测定}$ 带入方程得到 y (nmol/mL)。

3. 样本 P450 酶活性计算

● 按样本蛋白浓度计算：

单位定义：37℃下每 mg 蛋白每分钟催化产生 1 nmol 的 7-羟基香豆素为一个酶活力单位。

$P450 \text{ 酶活性 (U/mg prot)} = V_{样} \times y \div (V_{样} \times C_{pr}) \div T = y \div C_{pr} \div 10$

● 按样本质量计算：

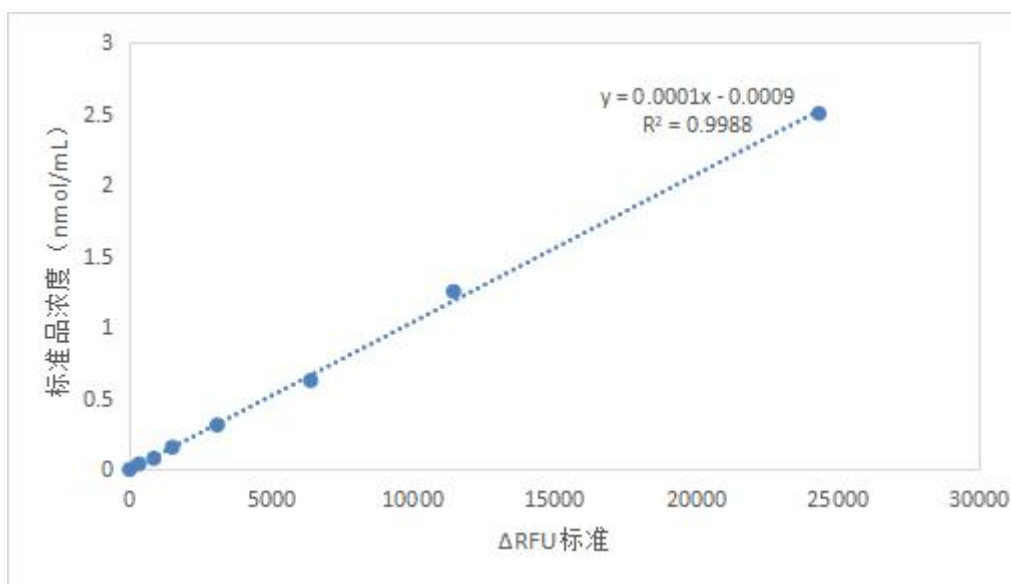
单位定义：37℃下每 g 组织每分钟催化产生 1 nmol 的 7-羟基香豆素为一个酶活力单位。

$P450 \text{ 酶活性 (U/g)} = V_{样总} \times y \div W \div T = y \div W \div 10$

$V_{样总}$ ：提取液总量，1 mL；T：反应时间，10 min；W：样本质量，g； $V_{样}$ ：加入反应体系中上清液体积，0.02 mL

07 结果展示

典型标准曲线： $y=0.0001x-0.0009$ ， $R^2=0.9988$



示例-1: 取 0.1019 g 兔肝, 用 Extraction Buffer 稀释 20 倍, 按照测定步骤操作, 用全黑 96 孔板测得: $\Delta RFU_{\text{测定}} = RFU_{\text{测定}} - RFU_{\text{对照}} = 18983 - 6787 = 12196$, 代入标准曲线, 计算 $y = 1.219$ 。按样本质量计算得: P450 酶活性 (U/g) = $y \div W \div 10 \times 20 = 23.925$ U/g。

08 FAQ

● 检测得到的样本 $\Delta RFU_{\text{测定}}$ 过高或者过低怎么办?

实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本稀释成不同浓度做预实验, 根据预实验的结果, 结合本试剂盒的线性范围: 0.0390625-2.5 nmol/mL, 选择合适的稀释倍数对样本进行检测。若 $\Delta RFU_{\text{测定}}$ 小于 500 需适当增大样本量, 若 $\Delta RFU_{\text{测定}}$ 大于 2.5 nmol/mL 标准品的 $\Delta RFU_{\text{测定}}$ 值, 样本可用 Extraction Buffer 进一步稀释, 或减少提取用样本量, 再重新进行测定。

● 是否可以检测其他样本类型?

试剂盒可以兼容检测细胞、细菌及血清 (浆) 等样本类型

细胞: 收集 1×10^7 个细胞, 用预冷的 PBS 清洗细胞, 800 g 离心 2 min, 弃上清。加入 1 mL Extraction Buffer 进行冰浴超声破碎。超声波破碎 5 min (功率 20% 或 200 W, 超声 3 s, 间隔 7 s, 重复 30 次), 10000 g, 4℃ 离心 10 min, 取上清置于冰上待测。

血清 (浆): 直接检测。

下面对细胞样本做示例展示

典型标准曲线: $y=0.0001x-0.0009$, $R^2=0.9988$

293 细胞: 取 1×10^7 个细胞, 加入 1 mL Extraction Buffer, 按照测定步骤操作, 用全黑 96 孔板测得: $\Delta RFU_{\text{测定}} = RFU_{\text{测定}} - RFU_{\text{对照}} = 9783 - 9338 = 445$, 代入标准曲线, 计算 $y = 0.0436$ 。按细胞数量计算得: P450 酶 (U/ 10^6 cell) = $V_{\text{样总}} \times y \div N \div T = y \div N \div 10 = 0.000436$ U/ 10^6 cells。其中 N 为细胞数量, 以 10^6 为单位 (例如细胞数量为 1×10^7 , N=10)。

● 为了便于高浓度样本检测, 标曲线性范围是否可以扩大?

可将标曲线性范围调整至 0.15625-10 nmol/mL, 取 50 μ L 0.25 mM Standard, 加入 1.2 mL Extraction Buffer, 即得 10 nmol/mL Standard, 可参考标准品配制部分进行梯度稀释。

● 检测过程中荧光信号是否稳定? 会不会随时间衰减而影响定量结果?

不会显著衰减。在本试剂盒推荐的 37℃ 反应条件下, 连续检测 3 小时内, 样本和标准曲线的荧光信号波动均控制在 20% 以内。这表明荧光信号在 3 小时内保持高度稳定, 不会因信号衰减影响酶活定量结果。

● 肝脏样本可以手动匀浆吗?

可以。推荐使用玻璃匀浆器在冰浴中手动操作，注意保持研磨力度一致并低温保护酶活性，样本量较少时尤为适用。

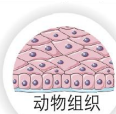
09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1010	CheKine™ 辅酶 II NADP(H) 含量检测试剂盒（微量法）
KTB1671	CheKine™ 总谷胱甘肽（T-GSH）/氧化型谷胱甘肽（GSSG）含量检测试剂盒（微量法）
KTB1630	CheKine™ 谷胱甘肽 S-转移酶（GST）检测试剂盒（微量法）
KTB1910	CheKine™ 活性氧（ROS）含量检测试剂盒（荧光法）
KTB1050	CheKine™ 脂质过氧化（丙二醛）含量检测试剂盒（微量法）

CheKine™ 细胞色素P450酶活性检测流程示意图

(AbbKine 货号：KTB1712)

样本处理



1 mL Extraction Buffer
冰浴研磨匀浆



10000 g，4℃离心10 min，取上清

体系配置

Working Reagent: 将Working Reagent III与Extraction Buffer进行1: 4混匀, 现用现配
标品工作液: 每个标准孔/空白孔准备100 μ L, 现配现用
Reagent I 90 μ L
Working Reagent II 10 μ L
测定工作液: 每个测定孔准备100 μ L, 现配现用
Reagent I 80 μ L
Working Reagent II 10 μ L
Working Reagent 10 μ L
对照工作液: 每个对照孔准备100 μ L, 现配现用
Reagent I 80 μ L
去离子水 10 μ L
Working Reagent 10 μ L, 以上配制好的工作液均需避光放置, 使用前需混匀。

标准品配制



样本
测定工作液

20 μ L 对照工作液
100 μ L



对照孔

100 μ L Extraction Buffer
100 μ L 标品工作液



空白孔

20 μ L Standard
100 μ L 标品工作液



标准孔

20 μ L
100 μ L

混匀后, 37℃避光孵育10 min

Reagent IV

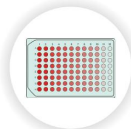
50 μ L Reagent IV
样本

50 μ L Reagent IV
20 μ L

50 μ L Reagent IV

50 μ L

充分混匀



激发波长为380 nm, 发射波长为450 nm
结果计算

数据检测