

细胞色素 P450 3A4 (CYP3A4) 活性检测试剂盒 (荧光法 1000rxn)

产品编号: YM0027

一、产品概述:

细胞色素 P450 3A4 (CYP3A4) 是人体重要的药物代谢酶, 可介导 50% 以上常用临床药物的代谢。CYP3A4 在人体肝脏、小肠等代谢组织中高表达, 代谢的药物包括他汀类降血脂药、替尼类抗肿瘤药物、苯二氮卓类镇静催眠药、质子泵抑制剂、大环内酯类抗生素等。因此, 此酶的活力与药物的代谢清除关系密切, 而共服药物则可能通过影响此酶的活性而导致药物-药物相互作用、甚至诱发药物毒副作用。本方法借助 CYP3A4 的高特异性荧光底物, 通过检测羟化反应前后荧光的变化, 测定 CYP3A4 的反应速率, 以表征不同样本中 CYP3A4 的活性, 以及评价潜在共服药物对 CYP3A4 酶活的调节作用。

本检测试剂具有背景干扰低、灵敏度高、适合高通量筛选等优势。



二、适用范围:

适用于人源及动物源组织匀浆、S9、微粒体的酶活检测, 以及 CYP3A4 活性调节剂的筛选及相互作用表征。

三、产品组分:

组分	YM0027 (1000rxn)
检测底物 Reagent A	100 μ L DMSO 溶解成 20 mM
检测产物 Reagent B	40 μ L DMSO 溶解成 1 mM
阳性抑制剂 Reagent C	40 μ L DMSO 溶解成 2 mM

四、保存条件:

组分	YM0027 (1000rxn)
检测底物 Reagent A	-20 $^{\circ}$ C 避光保存 3 个月
检测产物 Reagent B	-20 $^{\circ}$ C 避光保存 3 个月
阳性抑制剂 Reagent C	-20 $^{\circ}$ C 避光保存 3 个月

五、自备材料:

NADPH 或 NADPH 生成系统、 K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲溶液 (100 mM, pH = 7.4)、 $MgCl_2$ (40mM)、1.5 毫升离心管、涡旋混匀器、恒温混匀仪或水浴箱 (气浴箱)、荧光检测黑板、多功能荧光酶标仪、离心机。

六、实验步骤:

实验开始前, 备好检测样本、NADPH 或 NADPH 生成系统、 K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲溶液等, 检测试剂用推荐的试剂溶解, 然后进行下述操作。

- 1、样品准备: 检测样本 (微粒体、S9 等) 解冻后, 推荐用缓冲液稀释到 20 mg/mL, 于冰板上放置、备用。
- 2、产物检测标准曲线的配制: 按要求溶解标准产物后, 用 DMSO 分别稀释成 5、10、20、50、100、200、500 μ M, 再以标准产物稀释液 (缓冲溶液: 乙腈 = 2: 1 的混合体系) 稀释 100 倍配制产物标准曲线。

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦
标准产物浓度 (μ mol/L)	0.05	0.1	0.2	0.5	1	2	5

- 3、孵育反应及检测:

推荐检测底物浓度为 10 μ M, 推荐检测样本浓度为 0.5 mg/mL, 推荐其他反应条件为 37 $^{\circ}$ C 孵育 15-60 min。

建议采用如下反应起始方法: (以反应 30min 为例)

将除 $NADP^+$ 外其他成分混合均匀后, 于 37 $^{\circ}$ C 预孵 3min, 随后加入 $NADP^+$ 起始反应, 推荐每 20s 起始一个样本, 起始时间依次为: 3'20", 3'40", 4'00"; 反应时间到后, 依次终止: 33'20", 33'40", 34'00"; 目的是控制反应时间一致性。

酶活检测建议设置不加酶源的阴性对照样本。

活性调节剂 (抑制/激活) 的表征检测, 建议设置加阳性抑制剂作为对照样本。

反应结束后, 加入 100 μ L 冰乙腈强烈涡旋震荡; 反应液于 4 $^{\circ}$ C, 20000 g 离心 10 min; 吸取 200 μ L 上清液置于多孔黑板, 同时设置产物检测标准曲线并求得方程 ($y = ax + b$), 于激发波长 450 nm、发射波长 558 nm 条件下检测荧光。

- 4、活性计算:

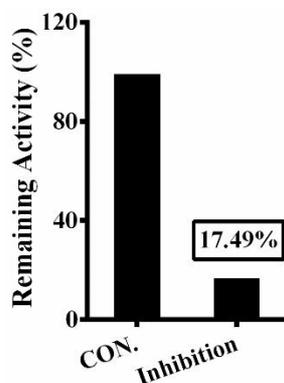
将样本的荧光强度带入标准曲线公式计算样品中产物的生成量。

酶反应速率 = 产物生成量/反应时间/蛋白量

以不同样本中酶反应速率表征 CYP3A4 的酶活性

七、附录

实验条件：检测底物浓度为 10 μM ，检测样本人肝 S9 (HLS9) 浓度为 0.5 mg/mL，阳性抑制剂 10 μM ，反应在 37 $^{\circ}\text{C}$ 进行 30 min，终止离心后测上清液荧光强度。



阳性抑制剂 10 μM 残余活性 17.49%

八、注意事项：

检测试剂形态为薄膜状或者粉末状，附着在离心管内壁上，使用前请将离心管短暂离心使其聚集到底部。小心开启管盖，避免粉末飞扬造成损失。加入所需的 DMSO，盖好管盖，涡旋震荡使其充分溶解。检测试剂配制完成后应避免反复冻融。

九、参考文献：

Target Enzyme-Activated Two-Photon Fluorescent Probes: A Case Study of CYP3A4 Using a Two-Dimensional Design Strategy. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2019; 58(29): 9959-63.