

线粒体呼吸链复合体IV活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

货号：BC0940

规格：50T/48S

产品内容：

提取液：液体80mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体21mL×2瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×2支，-20℃保存；

试剂三：粉剂×2 支，4℃保存；

工作液的配制：临用前取试剂一、试剂二、试剂三各一支，将试剂二和试剂三依次转移到试剂一中混合溶解。

产品说明：

线粒体复合体IV又称细胞色素C氧化酶，也是线粒体呼吸电子传递链主路和支路的共有成分，负责催化还原型细胞色素C的氧化，并最终把电子传递给氧生成水。还原型细胞色素C在550nm有特征光吸收，线粒体复合体IV催化还原型细胞色素C 生成氧化型细胞色素C，因此550nm光吸收下降速率能够反映线粒体复合体IV酶活性。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、复合体IV的提取：

- ① 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞，加入 1.0 mL 提取液，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- ② 4℃ 600 g 离心 10min。
- ③ 将上清液移至另一离心管中，4℃ 11000 g 离心 15min。
- ④ 上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的复合体IV（此步可选做，可以判断线粒体提取效果）。
- ⑤ 在沉淀中加入 400uL 提取液，超声波破碎（功率 20%，超声 5 秒，间隔 10 秒，重复 15 次），用于复合体IV酶活性测定，并且用于蛋白含量测定。

二、测定步骤：

1、可见分光光度计预热30min 以上，调节波长至550nm，蒸馏水调零。

2、样本测定

- (1) 将工作液置于37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）孵育15min；用不完的试剂4℃可保存一周；
- (2) 在1mL玻璃比色皿中分别加入

试剂名称	测定管	空白
样品（ μL ）	40	-
蒸馏水（ μL ）	-	40
工作液（ μL ）	800	800

立即混匀，分别记录测定管和空白管550nm处初始吸光值A1和1min后的吸光值A2，测定管的记为A1测定管，A2测定管，空白管的记为A1空白管，A2空白管。计算 $\Delta A1=A1\text{测定管}-A2\text{测定管}$ ， $\Delta A2=A1\text{空白管}-A2\text{空白管}$ ， $\Delta A=\Delta A1-\Delta A2$ 。

三、复合体IV活力单位的计算：

单位定义：每mg组织蛋白每分钟催化降解1nmol还原型细胞色素C定义为一个酶活力单位。

复合体IV活力(U/mg prot)=[$\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1099 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

V 反总：反应体系总体积， 8.4×10^{-4} L； ϵ ：细胞色素C摩尔消光系数， 1.91×10^4 L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.04 mL；T：反应时间，1 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL，需自行测定，建议使用本公司BCA蛋白浓度测定试剂盒。

注意事项：

1. 为保证实验结果的准确性，需先取 1-2 个样做预实验，如果测定的吸光值过高（高于 1），可用蒸馏水稀释上清液后再测定。计算结果时注意乘以稀释倍数。若 ΔA 大于 0.4，需将样本稀释适当倍数（计算公式中乘以相应稀释倍数），使 A1-A2 小于 0.2，可提高检测灵敏度；若 ΔA 偏小，则可以通过增加加入的样品体积来提高灵敏度。
2. 由于提取液中含有蛋白，所以在测定样品蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白含量（单独测量）。
3. 本试剂盒试剂足够完成 50 管反应。
4. 附：使用样本重量计算公式：（检测样本数为 50T/24S）

A、上清中复合体IV活力的计算：

按样本鲜重计算：

单位定义：每g组织在反应体系中每分钟催化降解1nmol还原型细胞色素C定义为一个酶活力单位。

复合体IV活力(U/g)=[$\Delta A1 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1099 \times \Delta A1 \div W$

$\Delta A1$ ：上清测定值；V 反总：反应体系总体积， 8.4×10^{-4} L； ϵ ：细胞色素 C 摩尔消光系数， 1.91×10^4 L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.04 mL；V 提取：加入提取液体积，1.0mL。w：样本重量，g。T：反应时间，1 min；

B、沉淀中复合体IV活力的计算：

按样本鲜重计算：

单位定义：每g组织在反应体系中每分钟催化降解1nmol还原型细胞色素C定义为一个酶活力单位。

复合体IV活力(U/g)=[$\Delta A2 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 440 \times \Delta A2 \div W$

$\Delta A2$ ：沉淀测定值；V 反总：反应体系总体积， 8.4×10^{-4} L； ϵ ：细胞色素 C 摩尔消光系数， 1.91×10^4 L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.04 mL；V 提取：加入提取液体积，0.4mL。w：样本重量，g。T：反应时间，1 min；

C、样本复合体IV总活力的计算：

样本复合体IV总活力即为上清中复合体IV活力与沉淀中复合体IV活力之和。

按样本鲜重计算：

复合体IV (U/g) = $1099 \times \Delta A1 \div W + 440 \times \Delta A2 \div W$