

线粒体复合体IV试剂盒说明书

分光光度法 25 管/24 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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。

测定原理：

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。

试剂的组成和配制：

产品名称	OP014-25T/24S	Storage
试剂一：液体	25ml	-20°C
试剂二：液体	5ml	-20°C
试剂三：液体	0.5ml	-20°C
试剂四：液体	10ml×2	4°C
试剂五：粉剂	2 支	-20°C
试剂六：粉剂	2 支	-20°C
说明书	一份	

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、冰和蒸馏水。

样本的前处理：

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离：

- 1、准确称取 0.1g 组织或收集 500 万细菌或细胞，加入 1ml 试剂一和 10ul 试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 2、将匀浆 600g，4°C离心 5min。
- 3、弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4°C离心 10min。
- 4、上清液即为除去线粒体的胞浆蛋白，可用于测定从线粒体泄漏的复合体IV（此步可选做）。
- 5、步骤 4 中的沉淀即为线粒体，加入 200ul 试剂二和 2uL1 试剂三，超声波破碎（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10 秒，重复 30 次），用于复合体IV酶活性测定。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



测定步骤:

1、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)工作液的配制: 临用前取试剂四、试剂五、试剂六各一支, 将试剂五和试剂六依次转移到试剂四中混合溶解; 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。

(2)将工作液置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 孵育 5min;

(3)在 1ml 玻璃比色皿中加入 80μl 样本和 800μl 工作液, 混匀, 记录 550nm 处初始吸光值 A1 和 37℃ 反应 30min 后的吸光值 A2, 计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

注意事项:

1、若 ΔA 大于 0.2, 需将样本用试剂二稀释适当倍数 (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。

2、动物肝脏样本由于酶活性过高, 1 分钟内吸光值就会到达平台期, 务必先进行 2 个样本的预测定。可将样本用试剂二稀释 10~50 倍, 反应时间缩到到 30 秒或 1 分钟 (计算公式中代入实际反应时间, 并乘以相应稀释倍数)。其他样本可按照正常测定步骤进行。

复合体IV活力单位的计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算

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

复合体IV活力(nmol/min /mg prot)=[$\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109$] \div (V 样 \times Cpr) \div T=19.20 \times $\Delta A \div$ Cpr

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织每分钟催化降解 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(nmol/min/g 鲜重)=[$\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109$] \div (W \times V 样 \div V 样总) \div T=3.88 \times $\Delta A \div$ W

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟催化降解 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(nmol/min/104 cell)=[$\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109$] \div (500 \times V 样 \div V 样总) \div T=0.008 \times ΔA

V 反总: 反应体系总体积, 8.8×10^{-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, 0.08 ml; V 样总: 加入提取液体积, 0.202 ml; T: 反应时间, 30 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/ml; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。

