

线粒体复合体IV试剂盒说明书

(货号: ADS-W-X010-96 微板法 96 样)

一、产品简介:

线粒体复合体IV又称细胞色素 C 氧化酶 (cytochrome-c oxidase, EC 1.9.3.1) (常用名为 CO, CcO, COX), 是含血红素/铜终端氧化酶大家族的成员之一。它是所有原核和一些真核生物电子传递链上的终端金属膜蛋白酶, 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。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 100mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂二	液体 20mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂三	液体 1 支	-20℃保存	
试剂四	粉剂 3 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 2mL 蒸馏水溶解备用
试剂五	粉剂 1 支	4℃保存	前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 1mL 蒸馏水溶解备用
试剂六	液体 18mL×1 瓶	4℃保存	

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、低温台式离心机、研钵、冰和蒸馏水。

四、线粒体复合体IV活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、线粒体制备 (提示: 整个线粒体的提取过程须保持 4℃低温环境):

- ① 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细菌/细胞, 加入 1mL 试剂一, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆, 转移至离心管后于 4℃×700g 离心 10min (若漂浮有脂肪, 可用枪头去除)。
- ② 弃沉淀, 上清液移至另一离心管中, 4℃×12000g 离心 10min。沉淀即为提取的线粒体, 用作第④步操作。
- ③ (选做) 上步得到的上清液即为胞浆提取物, 可作为样本用于测定从线粒体泄漏的线粒体呼吸链复合体IV, 用于判断线粒体提取效果。
- ④ 在沉淀 (线粒体) 中加入 200μL 试剂二和 2μL 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), 液体置于冰上用于线粒体复合体IV酶活性测定。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取, 或按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 550nm。
- ② 反应 mix 的制备: 新 EP 管中依次加入 1mL 试剂四和 100μL 试剂五 (试剂四: 五=1mL: 100μL), 涡旋混匀 5min, 室温避光放置 20min 后使用 (仔细观察有颜色变化), 一次性用不完可于 -20℃避光保存。
- ③ 若待测上清液比较浑浊 (蛋白浓度比较高), 可先对样本进行梯度稀释或按照下方加样

表梯度减少样本加样量（试剂六相应增加）进行预测定实验。

- ④ 将反应 mix 和试剂六置于 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）于恒温振荡培养箱或水浴锅中孵育 15min；在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂六	130
反应 mix	50
混匀，立即于 550nm 处读取 A1，置于 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种），15min 后读取 A2， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

- 【注】 1. 若 A1 值小于 0.45，则可减少样本加样体积（如 5μL，试剂六相应增加），则改变后的加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。
2. 若 ΔA 的值在零附近徘徊，可以增加样本加样体积（如 40μL，试剂六相应减少），则改变后的加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟氧化 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 /mg prot)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$] ÷ (V1 × Cpr) ÷ T = 61.05 × $\Delta A \div Cpr$

2、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟氧化 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)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$] ÷ (W × V1 ÷ V) ÷ T = 12.33 × $\Delta A \div W$

3、按细菌/细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌/细胞每分钟氧化 1nmol 还原型细胞色素 C 定义为一个酶活单位。

复合体IV活力(nmol/min/10⁴ cell)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$] ÷ (500 × V1 ÷ V) ÷ T = 0.025 × ΔA

ϵ ---还原型细胞色素 C 摩尔消光系数， 21.84×10^3 L/mol/cm； d---96 孔板光径，0.5cm；

V--- 加入提取液体积，0.202 mL；

V1--- 加入样本体积，0.02mL；

V2---反应体系总体积， 2×10^{-4} L；

T---反应时间，15min；

W---样本质量，g；

500---细胞或细菌总数，500 万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。