

线粒体复合体IV试剂盒说明书

(分光法 24 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 30mL×1 瓶 | -20°C保存 | |
| 试剂二 | 液体 5mL×1 瓶 | -20°C保存 | |
| 试剂三 | 液体 μ L×1 支 | -20°C保存 | |
| 试剂四 | 粉剂×3 支 | 4°C保存 | 用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加 1.5mL 蒸馏水溶解备用 |
| 试剂五 | 粉剂×1 支 | 4°C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 13mL×1 瓶 | 4°C保存 | |

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、可调式移液器、低温台式离心机、恒温振荡培养箱或水浴锅、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°C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°C×700g 离心 10min。
- ② 弃沉淀, 上清液移至另一离心管中, 4°C×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 200 μ L 试剂二和 2 μ L 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 可见分光光度计预热 30min 以上, 设定温度 25°C, 调节波长至 550nm, 蒸馏水调零。
- ② 反应 mix 的制备: 新 EP 管中依次加入 1mL 试剂四和 100 μ L 试剂五 (试剂四: 五=1mL: 100 μ L), 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°C 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 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

| 试剂名称（ μL ） | 测定管 |
|--|-----|
| 样本 | 60 |
| 试剂六 | 480 |
| 反应 mix | 170 |
| 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 0.9，则可减少样本加样体积（如 30 μL ，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 100 μL ，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)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$] \div (V1 \times Cpr) \div T=36.12 \times $\Delta A \div$ 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)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$] \div (W \times V1 \div V) \div T=7.3 \times $\Delta A \div$ 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)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$] \div (500 \times V1 \div V) \div T=0.015 \times ΔA

ϵ ---还原型细胞色素 C 摩尔消光系数，21.84 $\times 10^3$ L/mol/cm； d---光径，1cm；

V---加入提取液体积，0.202 mL；

V1---加入样本体积，0.06mL；

反应体系总体积，7.1 $\times 10^{-4}$ 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。