

线粒体复合体IV试剂盒说明书

(微板法 48 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 60mL×1 瓶	-20℃ 保存	
试剂二	液体 10mL×1 瓶	-20℃ 保存	
试剂三	液体 μ L×1 瓶	-20℃ 保存	
试剂四	粉剂×3 支	4℃ 保存;	用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 8mL×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。用移液器移除上清液, 留下沉淀 (沉淀即为线粒体)。
- ③ 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 酶标仪预热 30min 以上, 设定温度 25℃, 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 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℃ 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 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, 25°C下, 立即于 550nm 处读取 A1, 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)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$] $\div (V1 \times Cpr)$

$\div T=61.05 \times \Delta A \div Cpr$ 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)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$] $\div (W \times V1 \div V) \div T=12.33 \times \Delta A \div W$

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/ 10^4 cell)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$] $\div (500 \times V1 \div V) \div T=0.025 \times \Delta A$

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。