

## 线粒体呼吸链复合体IV活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1399

产品规格：100管/96样

### 产品简介：

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。

**注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

### 产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体75mL×2瓶	4℃
试剂一	液体21mL×1瓶	4℃
试剂二	粉剂×1支	-20℃
试剂三	粉剂×1支	4℃

### 溶液的配制：

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

### 需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

### 操作步骤：

#### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 称取约0.1g组织或收集500万细胞，加入1.0mL提取液，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。4℃ 600g离心10min。
2. 将上清液移至另一离心管中，4℃ 11000g离心15min。
3. 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）。
4. 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/酶标仪预热30min以上，调节波长至550nm，蒸馏水调零。
2. 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；
3. 样本测定（在微量玻璃比色皿/96孔板中分别加入）

试剂名称	测定管	空白管
样本(μL)	10	-
蒸馏水(μL)	-	10
工作液(μL)	200	200

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 $\Delta A1=A1$ 测定管-A2测定管， $\Delta A2=A1$ 空白管-A2空白管， $\Delta A=\Delta A1-\Delta A2$ 。

#### 三、复合体IV活力单位的计算



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

#### A、按微量玻璃比色皿计算：

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， $2.1 \times 10^{-4}$ L； $\epsilon$ ：细胞色素C摩尔消光系数， $1.91 \times 10^4$  L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；

V样：加入样本体积，0.01mL；T：反应时间，1min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL，需自行测定； $10^9$ ：单位换算系数， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

#### B、按96孔板计算

将上述计算公式中的d-1cm改为d-0.6cm进行计算即可。

#### 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 $\Delta A$ 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 $\Delta A$ 偏小，则可以通过增加加入的样本体积来提高灵敏度。
2. 由于提取液中含有一定浓度的蛋白（约1mg/mL），所以在测定样本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100T/48S）

##### A、上清中复合体IV活力的计算：

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质量)=[ $\Delta A_{\text{上清}} \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$ ] $\div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1099 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W$

$\Delta A_{\text{上清}}$ ：上清测定值；V反总：反应体系总体积， $2.1 \times 10^{-4}$ L； $\epsilon$ ：细胞色素C摩尔消光系数， $1.91 \times 10^4$  L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.01mL；V提取：加入提取液体积，1.0mL；W：样本重量，g；T：反应时间，1min； $10^9$ ：单位换算系数， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

##### B、沉淀中复合体IV活力的计算：

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质量)=[ $\Delta A_{\text{沉淀}} \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$ ] $\div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 440 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div W$

$\Delta A_{\text{沉淀}}$ ：沉淀测定值；V反总：反应体系总体积， $2.1 \times 10^{-4}$ L； $\epsilon$ ：细胞色素C摩尔消光系数， $1.91 \times 10^4$  L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.01mL；V提取：加入提取液体积，0.4mL。W：样本重量，g。T：反应时间，1min； $10^9$ ：单位换算系数， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

##### 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。

按样本质量计算：复合体IV（U/g质量）= $1099 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W + 440 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div W$

##### D、按96孔板计算：

将上述计算公式中的d-1cm改为d-0.6cm进行计算即可。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com