

线粒体复合体IV/细胞色素C氧化酶(CCO)试剂盒 (可见分光光度法)

产品货号: BA2832

产品规格: 24样

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。

产品内容:

产品名称	规格	保存条件	备注
试剂一	液体30mL×1瓶	-20℃	
试剂二	液体5mL×1瓶	-20℃	
试剂三	液体μL×1支	-20℃	
试剂四	粉剂×3支	2-8℃	使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	2-8℃	使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。
试剂六	液体13mL×1瓶	2-8℃	

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。

线粒体复合体IV活性检测:

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) 可见分光光度计预热30min以上, 设定温度25℃, 调节波长至550nm, 蒸馏水调零。



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

- (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℃(哺乳动物)或25℃(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℃(哺乳动物)或25℃(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30μL，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 小于0.01，可以增加样本加样体积(如100μL，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。

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 = 36.12 × $\Delta A \div Cpr$

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定义为一个酶活为单位。

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 = 7.3 × $\Delta A \div W$

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 = 0.015 × ΔA 。

ϵ ---还原型细胞色素 C 摩尔消光系数，21.84×10³L/mol/cm；d---96 孔板光径，1cm；V---加入提取液体积，0.202mL；V1---加入样本体积，0.06mL；V2---反应体系总体积，7.1×10⁻⁴L；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。



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