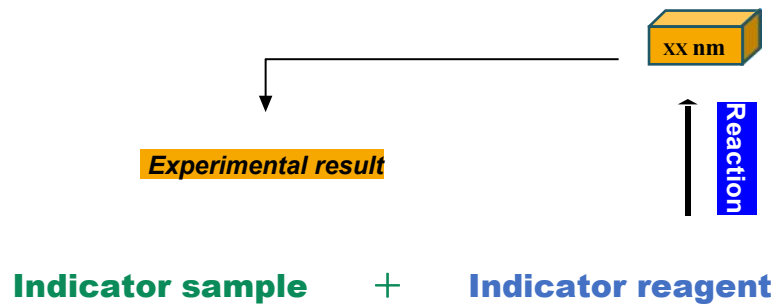


上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

## 线粒体复合体IV试剂盒说明书

### 可见分光光度法

**注意：**正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

产品说明：

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。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	25mL×1瓶	-20℃保存	
试剂二	5mL×1瓶	-20℃保存	
试剂三	0.5 mL×1瓶	-20℃保存	
试剂四	液体10mL×2瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂×2支	-20℃保存	
试剂六	粉剂×2支	-20℃保存	

操作步骤：

**正式实验前务必取2-3个预期差异较大的样本做与测定。**

一、样本的前处理：

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离：

- 1、准确称取0.1g组织或收集500万细菌或细胞，加入1mL试剂一和10uL试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 2、将匀浆600g，4℃离心5min。
- 3、弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11100g，4℃离心10min。
- 4、上清液即为除去线粒体的胞浆蛋白，可用于测定从线粒体泄漏的复合体IV（此步可选做）。
- 5、步骤④中的沉淀即为线粒体，加入200uL试剂二和2uL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），用于复合体IV酶活性测定。

## 二、测定步骤:

1、分光光度计预热30min以上, 调节波长至550nm, 蒸馏水调零。

### 2、样本测定

- (1) 工作液的配制: 临用前取试剂四、试剂五、试剂六各一支, 将试剂五和试剂六依次转移到试剂四中混合溶解。分批配制工作液是为了防止当天不能测完, 导致工作液失效。
- (2) 将工作液置于37°C (哺乳动物) 或25°C (其它物种) 孵育5min; 用不完的试剂4°C可保存一周;
- (3) 在1mL 玻璃比色皿中加入40 μL 样本和800 μL 工作液, 立即混匀, 记录550nm 处初始吸光值A1 和 1min 后的吸光值A2, 计算  $\Delta A = A1 - A2$ 。

注意: 若  $\Delta A$  大于0.2, 需将样本用试剂二稀释适当倍数 (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。

### 三、复合体IV活力单位的计算:

#### (1) 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1 nmol 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) =  $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1099 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

#### (2) 按样本鲜重计算

单位的定义: 每g 组织每分钟催化降解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 鲜重) =  $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 222 \times \Delta A \div$

W

#### (3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义: 每1 万个细菌或细胞每分钟催化降解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/10<sup>4</sup> cell) =  $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.444 \times \Delta A$

V 反总: 反应体系总体积,  $8.4 \times 10^{-4}$  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, 0.04 mL; V 样总: 加入提取液体积, 0.202 mL; T: 反应时间, 1 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。