

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0484

Size: 100T/96S

线粒体呼吸链复合体IV检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

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。

二、测定原理:

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。

三、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、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 100mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂二	液体 20mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂三	液体 1.5mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂四	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂×1 支	-20℃保存	
试剂六	粉剂×1 支	-20℃保存	

五、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。

六、测定步骤：

1、分光光度计或酶标仪预热 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：临用前将试剂五和试剂六依次转移到试剂四中混合溶解，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）孵育 5min；用不完的试剂 4℃可保存一周；

(2) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μL 样本和 200 μL 工作液，混匀，立即记录 550nm 处初始吸光值 A1 和 1min 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

注意点：若 ΔA 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。

七、复合体IV活力单位的计算：

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下：

(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 1nmol 还原型细胞色素 C 定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体IV活力 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$
$$= 1099 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$\text{复合体IV活力 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 222 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{复合体IV活力 (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 0.444 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 2.1×10^{-4} L； ϵ ：细胞色素 C 摩尔消光系数， 1.91×10^4 L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.01 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。

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下：

(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 1nmol 还原型细胞色素 C 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{复合体IV活力 (nmol/min/mg prot)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 2198 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{复合体IV活力 (nmol/min/g 鲜重)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \\ &\div T = 444 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{复合体IV活力 (nmol/min/10}^4\text{cell)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \\ &\div T = 0.888 \times \Delta A \end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积， 2.1×10^{-4} L； ϵ ：细胞色素 C 摩尔消光系数， 1.91×10^4 L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，0.202mL；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。