

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-S0763

Size: 50T/24S

## 线粒体呼吸链复合体IV检测试剂盒说明书

### 可见分光光度法

\*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。

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、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。

#### 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	25mL×1 瓶	-20°C 保存	
试剂二	5mL×1 瓶	-20°C 保存	
试剂三	0.5 mL×1 瓶	-20°C 保存	
试剂四	液体 10mL×2 瓶	4°C 保存	
试剂五	粉剂×2 支	-20°C 保存	
试剂六	粉剂×2 支	-20°C 保存	

#### 五、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。

## 1. 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°C离心5min。
- 3) 弃沉淀, 将上清液移至另一离心管中, 11100g, 4°C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。

## 2. 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。

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

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)=[ $\Delta A \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$ ]  $\div (W \times V_{样} \div V_{样总}) \div T$

=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/ $10^4$  cell)=[ $\Delta A \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$ ]  $\div (500 \times V_{样} \div V_{样总}) \div T$

=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。