

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

## 线粒体呼吸链复合体IV活性检测试剂盒说明书

### 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

#### 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。

#### 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。

#### 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。

#### 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	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	-

#### 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。

#### 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  $\Delta A$  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。

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。

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

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。

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

(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。

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

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，0.01 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， $2.1 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：细胞色素 C 摩尔消光系数， $1.91 \times 10^4$  L/mol/cm；d：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。