



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

线粒体呼吸链复合体IV活性检测试剂盒 (可见分光光度法)

货号: R41878

规格: 25T/24S

保质期: 6个月

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
试剂-A	25mL×1瓶	-20℃保存;
试剂-B	5mL×1瓶	-20℃保存;
试剂-C	0.5mL×1瓶	-20℃保存;
试剂-D	10mL×2瓶	2-8℃保存;
试剂-E	粉剂×2支	-20℃保存;
试剂-F	粉剂×2支	-20℃保存;

工作液的配制: 临用前将试剂-E和试剂-F各一支依次转移到一瓶试剂-D中混合溶解; 分批配制工作液是为了防止当天用不完, 导致工作液失效。

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

简介

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。

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。

自备用品:



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/匀浆器、冰和蒸馏水。

样品测定的前处理:

1. 准确称取0.1g 组织或收集500 万细胞, 加入1mL 试剂-A 和10uL 试剂-C, 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, 11000g, 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-B 和 2uL 试剂-C, 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 1mL 玻璃比色皿中加入 40μL 样本和 800μL 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 ΔA 大于 0.2, 需将样本用 试剂-B 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:

- (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。

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

此法需要自行测定样本蛋白浓度。



V 反总: 反应体系总体积, $8.4 \times 10^{-4} \text{L}$; ϵ : 细胞色素 C 摩尔消光系数, $1.91 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.04mL; T: 反应时间, 1min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL, 需自行测定; 109: 单位换算系数, $1 \text{mol} = 109 \text{nmol}$ 。

(2) 按样本质量计算 (检测样本数为 25T/12S)

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 1(U/g 质量) = $[\Delta A1 \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V \text{ 提取 1} \times V \text{ 样}) \div T = 1099 \times \Delta A1 \div W$

复合体IV活力 2(U/g 质量) = $[\Delta A2 \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V \text{ 提取 2} \times V \text{ 样}) \div T = 220 \times \Delta A2 \div W$

复合体IV总活力 (U/g 质量) = $1099 \times \Delta A1 \div W + 220 \times \Delta A2 \div W$

$\Delta A1$: 上清测定值; $\Delta A2$: 沉淀测定值 V; 反总: 反应体系总体积, $8.4 \times 10^{-4} \text{L}$; ϵ : 细胞色素 C 摩尔消光系数, $1.91 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.04 mL; V 提取 1: 加入提取液体积, 1.0 mL; V 提取 2: 加入提取液体积, 0.2 mL; T: 反应时间, 1 min; W: 样本质量, g; 10^9 : 单位换算系数, $1 \text{mol} = 10^9 \text{nmol}$ 。

源叶