



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(微量法)

货号: R41879

规格: 100T/96S

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	100mL×1瓶	-20℃保存;
试剂-B	20mL×1瓶	-20℃保存;
试剂-C	1.5mL×1瓶	-20℃保存;
试剂-D	10mL×2瓶	4℃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/酶标仪、台式离心机、水浴锅、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵、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. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 550nm，分光光度计蒸馏水调零。

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）在微量玻璃比色皿或 96 孔板中加入 10μL 样本和 200μL 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：若 ΔA 大于 0.4，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 0.4，可提高检测灵敏度；若 ΔA 偏小，则可以通过增加加入的样本体积来提高灵敏度。

复合体IV活力单位的计算:

a. 使用微量玻璃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 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) = $[\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1099 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

（2）按样本鲜重计算（检测样本数为 100T/48S）



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)=[$\Delta A1 \times V$ 反总 $\div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (W \div V$ 提取 1 $\times V$ 样) $\div T=1099 \times \Delta A1 \div W$

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

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

注: 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; T: 反应时间, 1 min; $\Delta A1$: 上清测定值; $\Delta A2$: 沉淀测定值; V 提取 1: 加入提取液体积, 1.01mL; V 提取 2: 加入提取液体积, 0.202mL。Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 10^9 : 单位换算系数, 1mol= 10^9 nmol。

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 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 $\times Cpr)$ $\div T=2198 \times \Delta A \div Cpr$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

(2) 按样本鲜重计算 (检测样本数为 100T/48S)

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)=[$\Delta A1 \times V$ 反总 $\div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (W \div V$ 提取 1 $\times V$ 样) $\div T=2198 \times \Delta A1 \div W$

复合体IV活力 2(U/g 质量)=[$\Delta A2 \times V$ 反总 $\div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (W \div V$ 提取 2 $\times V$ 样) $\div T=440 \times \Delta A2 \div W$

复合体IV总活力 (U/g 质量) = $2198 \times \Delta A1 \div W + 440 \times \Delta A2 \div W$

注: 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; T: 反应时间, 1 min; $\Delta A1$: 上清测定值; $\Delta A2$: 沉淀测定值; V 提取 1: 加入提取液



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

体积, 1.01mL; V 提取 2: 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; 10^9 : 单位换算系数, $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。



源叶