



线粒体复合体IV/细胞色素C氧化酶(CCO)试剂盒

可见分光光度法

货号: R45015-24S/48S

产品简介:

线粒体复合体IV又称细胞色素C氧化酶 (cytochrome-c oxidase, EC 1.9.3.1)(常用名为 CO, CcO, COX), 是含血红素/铜终端氧化酶大家族的成员之一。它是所有原核和一些真核生物电子传递链上的终端金属膜蛋白酶, 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。

试剂盒组分与配制:

试剂名称	R45015-24S	保存要求	备注
试剂一	液体30mL×1瓶	-20℃保存	
试剂二	液体5mL×1瓶	-20℃保存	
试剂三	液体μL×1支	-20℃保存	
试剂四	粉剂×3支	4℃保存;	使用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加1.5mL蒸馏水溶解备用
试剂五	粉剂×1支	4℃保存;	前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加1mL蒸馏水溶解备用
试剂六	液体13mL×1瓶	4℃保存	

试剂名称	R45015-48S	保存要求	备注
试剂一	液体60mL×1瓶	-20℃保存	
试剂二	液体10mL×1瓶	-20℃保存	
试剂三	液体μL×1支	-20℃保存	
试剂四	粉剂×3支	4℃保存;	使用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加3mL蒸馏水溶解备用



试剂五	粉剂×1支	4℃保存;	前甩几下或离心使粉剂落入底部, 再加1mL蒸馏水溶解备用
试剂六	液体28mL×1瓶	4℃保存	

所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径1cm)、可调式移液器、低温台式离心机、恒温振荡培养箱或水浴锅、研钵、冰和蒸馏水。

线粒体复合体IV 活性测定:

建议正式实验前选取2个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、线粒体制备(提示: 整个线粒体的提取过程须保持4℃低温环境):

①称取约0.1g 组织或收集500万细菌/细胞, 加入1mL 试剂一, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆, 转移至离心管后于4℃×700g 离心10min (若漂浮有脂肪, 可用枪头去除)。

②弃沉淀, 上清液移至另一离心管中, 4℃×12000g 离心10min。沉淀即为提取的线粒体, 用作第④步操作。

③(选做)上步得到的上清液即为胞浆提取物, 可作为样本用于测定从线粒体泄漏的线粒体呼吸链复合体IV, 用于判断线粒体提取效果。

④在沉淀(线粒体)中加入200 μL试剂二和2μL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), 液体置于冰上用于线粒体复合体IV酶活性测定。

【注】:若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为1:5~10的比例进行提取, 或按照细菌/细胞数量(10^4):提取液(mL) 为500~1000:1的比例进行提取。

2、上机检测:

①可见分光光度计预热30min以上, 设定温度25℃, 调节波长至550nm, 蒸馏水调零。



② 反应mix 的制备: 新 EP 管中依次加入1mL 试剂四和100μL 试剂五(试剂四: 五=1mL: 100μL), 涡旋混匀5min, 室温避光放置20min 后使用(仔细观察有颜色变化), 一次性用不完可于-20℃避光保存。

③ 若待测上清液比较浑浊(蛋白浓度比较高), 可先对样本进行梯度稀释或按照下方加样表梯度减少样本加样量(试剂六相应增加)进行预测定实验。

④ 将反应mix 和试剂六置于37℃(哺乳动物)或25℃(其它物种)于恒温振荡培养箱或水浴锅中孵育15min;在1mL玻璃比色皿(光径1cm)中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管
样本	60
试剂六	480
反应mix	170
混匀, 立即于550nm处读取A1,置于37℃(哺乳动物)或25℃(其它物种),15min后读取A2,ΔA=A1-A2。	

结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟氧化1nmol 还原型细胞色素C 定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体IV 活力(nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (V_1 \times C_{pr}) \div T \\ = 36.12 \times \Delta A \div C_{pr}$$

2、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每分钟氧化1nmol 还原型细胞色素C 定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体IV 活力(nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ = 7.3 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 每1万个细菌/细胞每分钟氧化1nmol 还原型细胞色素C 定义为一个酶活单位。



$$\text{复合体IV 活力}(\text{nmol/min}/10^4\text{cell})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T \\ = 0.015 \times \Delta A$$

ϵ --- 还原型细胞色素 C 摩尔消光系数, $21.84 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$;

d --- 光径, 1cm;

V --- 加入提取液体积, 0.202 mL;

V_1 --- 加入样本体积, 0.06mL;

V_2 --- 反应体系总体积, $7.1 \times 10^{-4} \text{L}$;

T --- 反应时间, 15min;

W --- 样本质量, g;

500--- 细胞或细菌总数, 500万;

C_{pr} --- 样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的BCA蛋白含量检测试剂盒。



源叶