

线粒体呼吸链复合体IV活性检测试剂盒（可见分光光度法）

产品货号：BA1398

产品规格：25管/24样

产品简介：

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。

注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体40mL×1瓶	4℃
试剂一	液体21mL×1瓶	4℃
试剂二	粉剂×1支	-20℃
试剂三	粉剂×1支	4℃

溶液的配制：

工作液的配制：临用前取试剂一、试剂二、试剂三，将试剂二和试剂三依次转移到试剂一中混合溶解。

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/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

- 称取约0.1g组织或收集500万细胞，加入1.0mL提取液，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。4℃ 600g离心10min。
- 将上清液移至另一离心管中，4℃ 11000g离心15min。
- 上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的复合体IV（此步可选做，可以判断线粒体提取效果）。
- 在沉淀中加入400μL提取液，超声波破碎（功率20%，超声5秒，间隔10秒，重复12次），用于复合体IV酶活性测定，并且用于蛋白含量测定。

二、测定步骤

- 可见分光光度计预热30min 以上，调节波长至550nm，蒸馏水调零。
- 将工作液置于37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）孵育15min；用不完的试剂4℃可保存一周；
- 样本测定（在1mL玻璃比色皿中分别加入）

试剂名称	测定管	空白管
样本（μL）	40	-
蒸馏水（μL）	-	40
工作液（μL）	800	800

立即混匀，分别记录测定管和空白管 550nm 处初始吸光值 A1 和 1min 后的吸光值 A2，测定管的记为 A1 测定管，A2 测定管，空白管的记为 A1 空白管，A2 空白管。计算 $\Delta A1=A1$ 测定管-A2 测定管， $\Delta A2=A1$ 空白管-A2 空白管， $\Delta A=\Delta A1-\Delta A2$ 。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

三、复合体IV活力单位的计算

按样本蛋白浓度计算：

单位定义：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。

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

V 反总：反应体系总体积， 8.4×10^{-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，0.04mL；T：反应时间，1min；C_{pr}：样本蛋白质浓度，mg/mL，需自行测定； 10^9 ：单位换算系数， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

注意事项：

1. 为保证实验结果的准确性，需先取1-2个样做预实验，如果测定的初始吸光值过高（高于1），可用提取液稀释后再测定。计算结果时注意乘以稀释倍数；若 ΔA 大于0.2，需将样本稀释适当倍数（计算公式中乘以相应稀释倍数），使 $A_1 - A_2$ 小于0.2，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（计算公式中改变V样的体积）。
2. 由于提取液中含有一定浓度的蛋白（约1mg/mL），所以在测定样本蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白含量（单独测量）。
3. 本试剂盒试剂足够完成25管反应。
4. 附：使用样本重量计算公式：（检测样本数为25T/12S）

A、上清中复合体IV活力的计算：

单位定义：每g组织在反应体系中每分钟催化降解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质量)=[$\Delta A_{\text{上清}} \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1099 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W$

$\Delta A_{\text{上清}}$ ：上清测定值；V反总：反应体系总体积， 8.4×10^{-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，0.04mL；V提取：加入提取液体积，1.0mL；W：样本质量，g；T：反应时间，1min； 10^9 ：单位换算系数， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

B、沉淀中复合体IV活力的计算：

单位定义：每g组织在反应体系中每分钟催化降解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质量)=[$\Delta A_2 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 440 \times \Delta A_2 \div W$

$\Delta A_{\text{沉淀}}$ ：沉淀测定值；V反总：反应体系总体积， 8.4×10^{-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，0.04 mL；V提取：加入提取液体积，0.4mL；W：样本质量，g；T：反应时间，1min； 10^9 ：单位换算系数， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

C、样本复合体IV总活力的计算：

样本复合体IV总活力即为上清中复合体IV活力与沉淀中复合体IV活力之和。

按样本质量计算：复合体IV（U/g质量）= $1099 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W + 440 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div W$



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com