

线粒体复合体IV试剂盒说明书

微量法 100管/96样

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：

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；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。（2）在微量石英比色皿或96孔板中加入20μL样本和200μL工作液，混匀，记录550nm处初始吸光值A1和 37℃反应30min后的吸光值A2，计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

注意点：

1. 若 ΔA 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。
2. 动物肝脏样本由于酶活性过高，1分钟内吸光值就会到达平台期，务必先进行2个样本的预测定。可将样本用试剂二稀释10~50倍，反应时间缩到到30秒或1分钟（计算公式中代入实际反应时间，并乘以相应稀释倍数）。其他样本可按照正常测定步骤进行。

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。

$$\text{复合体IV活力(nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 19.20 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{复合体IV活力(nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3.88 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{复合体IV活力(nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.008 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积, 2.2×10^{-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, 0.02 mL; V样总: 加入提取液体积, 0.202 mL; T: 反应时间, 30 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。

$$\text{复合体IV活力(nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 38.39 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{复合体IV活力(nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 7.76 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{复合体IV活力(nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.016 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积, 2.2×10^{-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, 0.02 mL; V样总: 加入提取液体积, 0.202 mL; T: 反应时间, 30 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。