

线粒体复合体IV试剂盒说明书

分光光度法 25 管/24 样

注 意：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、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

试剂一：25mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂二：5mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂三：0.5 mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂四：液体 10mL×2 瓶，4℃保存；

试剂五：粉剂×2 支，-20℃保存；

试剂六：粉剂×2 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 万细菌或细胞，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，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：临用前取试剂四、试剂五、试剂六各一支，将试剂五和试剂六依次转移到试剂四中混合溶解；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

（2）将工作液置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）孵育 5min；

(3) 在 1mL 玻璃比色皿中加入 80 μ L 样本和 800 μ L 工作液，混匀，记录 550nm 处初始吸光值 A1 和 37 $^{\circ}$ C 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：

(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(nmol/min/mg prot)=[$\Delta A \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (V_{样} \times C_{pr}) \div T=19.20 \times \Delta A \div C_{pr}$

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。

复合体IV活力(nmol/min/g 鲜重)=[$\Delta A \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (W \times V_{样} \div V_{样总}) \div T=3.88 \times \Delta A \div W$

(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。

复合体IV活力(nmol/min/ 10^4 cell)=[$\Delta A \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (500 \times V_{样} \div V_{样总}) \div T=0.008 \times \Delta A$

V_{反总}: 反应体系总体积, 8.8 $\times 10^{-4}$ L; ϵ : 细胞色素 C 摩尔消光系数, 1.91 $\times 10^4$ L / mol / cm; d: 比色皿光径, 1cm; V_样: 加入样本体积, 0.08 mL; V_{样总}: 加入提取液体积, 0.202 mL; T: 反应时间, 30 min; C_{pr}: 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。
