

## 线粒体呼吸链复合体IV/细胞色素 C 氧化酶检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1103

保存：-20℃避光保存 6 个月

规格：48T/48S 96T/96S

适用样本：动植物组织和细胞

### 产品简介

线粒体呼吸链复合体IV又称细胞色素 C 氧化酶，也是线粒体电子传递呼吸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。本试剂盒提供了一种简单的检测方法，用于检测生物体内线粒体呼吸链复合体IV活性，其原理是还原型细胞色素 C 在 550nm 有特征光吸收，线粒体呼吸链复合体 IV 催化还原型细胞色素 C 生成氧化型细胞色素 C，氧化型细胞色素 C 在 550nm 没有特征光吸收，因此 550nm 光吸收下降速率能够反映线粒体呼吸链复合体IV酶活性。

### 产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
试剂一	50mL	100mL	4℃ 保存
试剂二	10mL	20mL	4℃ 保存
试剂三	1mL	2mL	4℃ 避光保存
试剂四	10mL	20mL	4℃ 保存
试剂五	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃ 避光保存
试剂六	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃ 避光保存

### 自备耗材

酶标仪或分光光度计（能测 550nm 处的吸光度）及恒温箱  
 96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头  
 制冰机、低温离心机  
 去离子水  
 匀浆器（如果是组织样本）

### 试剂准备

**注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。**

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

试剂二：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

试剂三：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 避光保存。

工作液的配制：临用前，取试剂五和试剂六各一瓶，一共加入 10mL 试剂四溶解以后混合在一起，如果检测样本是哺乳动物来源，请置于 37℃ 孵育 5min；如果样本是其他物种，则置于 25℃ 孵育 5min。工作液尽量当天使用或分装-20℃ 保存一个月，避免反复冻融。

### 样本制备

**注意：推荐使用新鲜样本，以保证酶的活力。**

线粒体呼吸链复合体IV的提取：

## 产品说明书

1. 准确称取 0.1g 组织或收集 500 万个细胞，加入 1mL 试剂一和 10 $\mu$ L 试剂三，冰浴匀浆；
2. 离心匀浆液，600g，5min，4 $^{\circ}$ C，收集上清液至另一新的离心管中，舍弃沉淀；
3. 再次离心上清，11,000g，10min，4 $^{\circ}$ C，沉淀即为提取的线粒体，用作第 5 步操作；
4. (选做)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；
5. 在沉淀中加入 200 $\mu$ L 试剂二和 2 $\mu$ L 试剂三，充分重悬沉淀，用于下一步线粒体呼吸链复合体IV酶活性检测。

### 实验步骤

1. 酶标仪和分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 550nm，分光光度计去离子水调零。
2. 在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入 10 $\mu$ L 样本和 200 $\mu$ L 工作液，充分混匀后，立即读取 550nm 处 0min 的初始吸光值  $A_1$  和 1min 后的吸光值  $A_2$ ，计算  $\Delta A=A_1-A_2$ 。

**注意：**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  $\Delta A$  过高（高于 1.0），可用试剂二稀释样本后再测定，计算结果时注意乘以稀释倍数。若  $\Delta A$  偏小，则可以通过增加加入的样本体积来提高灵敏度或适当延长反应时间，注意调整计算公式中的  $V_{\text{样}}$ 、 $V_{\text{反应}}$  或  $T$ 。

2. 测定反应的温度对测定结果有影响，请控制在 25 $^{\circ}$ C（一般物种）或者 37 $^{\circ}$ C（哺乳动物）。
3. 因通过反应速率计算酶活，使用 96 孔板时请根据操作速度控制一次测定的样本数（通常一次测定 4 个样本）或者使用多通道移液器进行加工作液的操作，来更好的控制时间，这样可以一次多测一些样本。

### 结果计算

#### A. 使用 96 孔板测定的计算公式

##### 1. 按样本鲜重计算

单位的定义：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。

上清中线粒体呼吸链复合体IV活力的计算：

$$\text{复合体IV上清活力(U/g 鲜重)} = [\Delta A_1 \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 2221 \times \Delta A_1 \div W$$

沉淀中复合体IV活力的计算：

$$\text{复合体IV沉淀活力(U/g 鲜重)} = [\Delta A_2 \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V_{\text{重悬}} \times V_{\text{样}}) \div T = 444 \times \Delta A_2 \div W$$

复合体IV总活力的计算：

总复合体IV活力即为上清中线粒体呼吸链复合体IV活力与沉淀中线粒体呼吸链复合体IV活力之和。

按样本鲜重计算：总复合体IV活力(U/g 鲜重) =  $2221 \times \Delta A_1 \div W + 444 \times \Delta A_2 \div W$

##### 2. 按细胞密度计算

单位的定义：每 1 万个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。

上清中线粒体呼吸链复合体IV活力的计算：

$$\text{复合体IV上清活力(U/10}^4 \text{ cells)} = [\Delta A_1 \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times 500) \div T = 4.44 \times \Delta A_1$$

沉淀中复合体IV活力的计算：

$$\text{复合体IV沉淀活力(U/10}^4 \text{ cells)} = [\Delta A_2 \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{重悬}} \times 500) \div T = 0.888 \times \Delta A_2$$

复合体IV总活力的计算：

总复合体IV活力即为上清中线粒体呼吸链复合体IV活力与沉淀中线粒体呼吸链复合体IV活力之和。

按细胞密度计算：总复合体IV活力(U/10<sup>4</sup> cells) =  $4.44 \times \Delta A_1 + 0.888 \times \Delta A_2$

$V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积， $2.1 \times 10^{-4}$ L； $\epsilon$ ：细胞色素 C 摩尔消光系数， $19.1 \times 10^3$ mol/L/cm； $d$ ：96 孔板光径，0.5cm； $10^9$ ：单位换算系数， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ ； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01mL； $T$ ：反应时间，1min； $\Delta A_1$ ：上清测定值； $W$ ：样本重量，g； $V_{\text{提取}}$ ：提取体系体积，1.01mL； $\Delta A_2$ ：沉淀测定值； $V_{\text{重悬}}$ ：重悬沉淀体积，0.202mL；500：细胞总数，500 万。

#### B. 使用微量玻璃比色皿进行测定的计算公式

将上述计算公式中光径  $d$ ：0.5cm 调整为  $d$ ：1cm 进行计算即可。

### 注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

### 相关产品:

- PMK1100 线粒体呼吸链复合体 I /NADH-辅酶 Q 还原酶检测试剂盒 (微量法)
- PMK1101 线粒体呼吸链复合体 II /琥珀酸-辅酶 Q 还原酶检测试剂盒 (微量法)
- PMK1102 线粒体呼吸链复合体 III /CoQ-细胞色素 C 还原酶检测试剂盒 (微量法)
- PMK1104 线粒体呼吸链复合体 V /ATP 合酶/三磷酸腺苷合酶检测试剂盒 (微量法)

更多产品详情了解, 请关注公众号:

