



线粒体呼吸链复合体 IV 活性检测试剂盒

Mitochondrial Respiratory Complex IV Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



线粒体呼吸链复合体 IV 活性检测试剂盒

Mitochondrial Respiratory Complex IV Activity Assay Kit

一、产品描述

线粒体呼吸链复合体IV，又称细胞色素 C 氧化酶，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，最终将电子传递给氧生成水，同时将质子跨越线粒体内膜，形成质子梯度推动 ATP 合成，其活性测定对呼吸电子传递链 (ETC) 状态的分析具有重要意义。

线粒体呼吸链复合体 IV 能够催化还原型细胞色素 C 生成氧化型细胞色素 C，还原型细胞色素 C 在 550 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值下降速率即可表征线粒体复合体 IV 的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 80 mL×2 瓶	4°C 保存	-
试剂一	液体 40 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	粉剂×2 瓶	-20°C 避光保存	使用前每瓶加入 14 mL 试剂一充分溶解 (分装后-20°C可保存 2 周，避免反复冻融)
试剂三	粉剂×2 瓶	4°C 避光保存	使用前每瓶加入 6 mL 试剂一充分溶解 (分装后-20°C可保存 2 周，避免反复冻融)
检测工作液的制备 (现用现配): 使用前根据使用量按试剂二: 试剂三= 9:1 的体积比配制，充分混匀即为检测工作液。			

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 酶标仪、96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1. 粗酶液的制备 (可根据预实验结果适当调整样本量及比例)

- ①称取 100 mg 组织或收集 500 万细胞，加入 1 mL 提取液，使用匀浆器或研钵冰浴研磨至匀浆，匀浆液 4°C 600 g 离心 10 min，弃沉淀，取上清；
- ②吸取步骤①离心后上清液至另一离心管中，4°C 12000 g 离心 10 min；
- ③步骤②离心后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)；
- ④步骤②离心后沉淀中加入 400 μL 提取液，冰浴超声破碎 (功率 20%或 200 W，超声 5 s，间隔 10 s，重复 15 次) 即为**粗酶液**，用于线粒体复合体 IV 活性测定 (可用于蛋白含量测定)。

2. 测定步骤

- ①酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 550 nm。
- ②试验前将检测工作液 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）预热 15 min。
- ③在 96 孔板中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	空白组 (μL)
粗酶液	10	-
蒸馏水	-	10
检测工作液	200	200

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 10 s（总时间）时 550 nm 处吸光值，记为 A1 测定和 A1 空白；②准确反应 60 s，测定 70 s（总时间）时 550 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 空白；③计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}}$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}}$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ 。注：空白组只需测定 1-2 次。

3. 线粒体呼吸链复合体 IV 活性计算

单位定义：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。

$$\text{复合体 IV (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{2198.95 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.01 mL；V 反总：反应体系总体积， 2.1×10^{-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，0.5 cm；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；T：反应时间，1 min； 10^9 ：单位换算系数，1 mol = 10^9 nmol。

四、注意事项

- ①若 A1 测定大于 1.0 或 ΔA 大于 0.2，建议将粗酶液适当稀释后再进行测定；若 ΔA 小于 0.02，建议适当延长酶促反应时间或制备更高浓度样本后再进行测定，计算时相应修改；
- ②提取液中含有约 1 mg/mL 的蛋白，测定样本蛋白浓度时需减去提取液自身的蛋白含量；
- ③准确在 10 s 和 70 s 处完成吸光值的测定，以确保实验结果的准确性和重复性；若同时测定多个样本建议使用多道移液器且分批进行测定，以确保组间反应时间一致；
- ④为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系；

⑤推荐使用样本蛋白浓度计算活性，若使用样本质量计算，则需加测胞浆提取物酶活，上清和沉淀酶活之和即为总酶活。

附：使用样本质量计算的公式

单位定义：每 g 组织每分钟催化降解 1 nmol 还原型细胞色素 C 定义为一个酶活力单位。

$$\text{上清中复合体 IV (U/g)} = \frac{\Delta A1 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{2198.95 \times \Delta A1}{W}$$

$$\text{沉淀中复合体 IV (U/g)} = \frac{\Delta A2 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{879.58 \times \Delta A2}{W}$$

$$\text{复合体 IV (U/g)} = \text{上清中复合体 IV} + \text{沉淀中复合体 IV} = \frac{2198.95 \times \Delta A1}{W} + \frac{879.58 \times \Delta A2}{W}$$

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.01 mL；V 反总：反应体系总体积，2.1×10⁻⁴ L；V 提：提取过程中第一次加入提取液的体积，1 mL；V 样总：沉淀重悬体积，0.4 mL；ε：细胞色素 C 摩尔消光系数，1.91×10⁴ L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.5 cm；T：反应时间，1 min；W：样本质量，g；10⁹：单位换算系数，1 mol=10⁹ nmol；ΔA1：上清测定值；ΔA2：沉淀测定值。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

