

线粒体呼吸链复合体IV活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: AC10216

规格: 25T/24S、50T/48S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称/规格	25T	50T	保存条件
提取液	液体 40 mL×1 瓶	液体 80 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 30mL×1 瓶	液体 30mL×2 瓶	2-8°C保存
试剂二	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C保存
试剂三	粉剂×1 支	粉剂×2 支	2-8°C保存

25T 溶液的配制:

- 1、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, 用不完的试剂-20°C分装保存 2 周, 避免反复冻融。

50T 溶液的配制:

- 1、工作液的配制: 临用前取一瓶试剂一、一支试剂二和一支试剂三, 将试剂二和试剂三依次转移到试剂一中混合溶解, 用不完的试剂-20°C分装保存 2 周, 避免反复冻融。

产品说明:

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。

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)**

1. 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞, 加入 1.0 mL 提取液, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆。4 °C 600g 离心 10min。
2. 将上清液移至另一离心管中, 4 °C 11000g 离心 15min。
3. 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)。
4. 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 15 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

- 1、可见分光光度计预热30min以上, 调节波长至550nm, 蒸馏水调零。
- 2、将工作液置于37°C (哺乳动物) 或25°C (其它物种) 孵育15min; 用不完的试剂4°C可保存一周;
- 3、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
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 $\Delta A1 = A1 \text{ 测定管} - A2 \text{ 测定管}$ ， $\Delta A2 = A1 \text{ 空白管} - A2 \text{ 空白管}$ ， $\Delta A = \Delta A1 - \Delta A2$ 。

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

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

V反总：反应体系总体积， $1.05 \times 10^{-3} \text{L}$ ； ϵ ：细胞色素C摩尔消光系数， $1.91 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$ ；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.05 mL；T：反应时间，1min；Cpr：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，如果测定的吸光值过高（高于 1），可用蒸馏水稀释上清液后再测定。计算结果时注意乘以稀释倍数。若 ΔA 大于 0.4，需将样本稀释适当倍数（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；若 ΔA 偏小，则可以通过增加加入的样本体积来提高灵敏度。
- 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 50 管反应。
- 4、附:使用样本重量计算公式：（检测样本数为 50T/24S）

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， $1.05 \times 10^{-3} \text{L}$ ； ϵ ：细胞色素C摩尔消光系数， $1.91 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$ ；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.05mL；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)=[$\Delta A \text{ 沉淀} \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (W \div V \text{ 提取} \times V \text{ 样}) \div T = 440 \times \Delta A \text{ 沉淀} \div W$

$\Delta A \text{ 沉淀}$ ：沉淀测定值；V反总：反应体系总体积， $1.05 \times 10^{-3} \text{L}$ ； ϵ ：细胞色素C摩尔消光系数， $1.91 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$ ；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.05mL；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) = $1099 \times \Delta A \text{ 上清} \div W + 440 \times \Delta A \text{ 沉淀} \div W$

实验实例:

1、取 0.1g 兔肝脏进行样本处理,按照测定步骤操作,测得 $\Delta A_2 = A_1 \text{ 空白管} - A_2 \text{ 空白管} = 0.79 - 0.781 = 0.009$, 上清液的 $\Delta A_1 = A_1 \text{ 测定管} - A_2 \text{ 测定管} = 0.822 - 0.792 = 0.03$, $\Delta A \text{ 上清} = \Delta A_1 - \Delta A_2 = 0.03 - 0.009 = 0.021$, 沉淀中的 $\Delta A_1 = A_1 \text{ 测定管} - A_2 \text{ 测定管} = 0.992 - 0.792 = 0.2$, $\Delta A \text{ 沉淀} = \Delta A_1 - \Delta A_2 = 0.2 - 0.009 = 0.191$, 按样本质量计算:
上清液中复合体IV活力(U/g 质量) = $1099 \times \Delta A \text{ 上清} \div W = 1099 \times 0.021 \div 0.1 = 230.79 \text{ U/g 质量}$
沉淀中复合体IV活力(U/g 质量) = $440 \times \Delta A \text{ 沉淀} \div W = 440 \times 0.191 \div 0.1 = 840.4 \text{ U/g 质量}$
则样本复合体IV总活力 (U/g 质量) = $1099 \times \Delta A \text{ 上清} \div W + 440 \times \Delta A \text{ 沉淀} \div W$
 $= 1099 \times 0.021 \div 0.1 + 440 \times 0.191 \div 0.1 = 1071.19 \text{ U/g 质量}$ 。

相关发表文献:

- [1] Qiuli OuYang, Nengguo Tao, Miaoling Zhang. A Damaged Oxidative Phosphorylation Mechanism Is Involved in the Antifungal Activity of Citral against *Penicillium digitatum*. *Frontier in Immunology*. February 2018;(IF4.259)
- [2] Huazhang Zhu, Weizhen Zhang, Yingying Zhao, et al. GSK3 β -mediated tau hyperphosphorylation triggers diabetic retinal neurodegeneration by disrupting synaptic and mitochondrial functions. *Molecular Neurodegeneration*. November 2018;(IF8.274)
- [3] Wang M, Zhang Y, Xu M, et al. Roles of TRPA1 and TRPV1 in cigarette smoke-induced airway epithelial cell injury model[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2019, 134: 229-238.
- [4] Bao Z, Xu X, Chao H, et al. ERK/Nrf2/HO-1 pathway-mediated mitophagy alleviates traumatic brain injury-induced intestinal mucosa damage and epithelial barrier dysfunction[J]. 2017.
- [5] Li N, Qin S, Xie L, et al. Elevated Serum Potassium Concentration Alleviates Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury via Mitochondrial Preservation[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 48(4): 1664-1674.

参考文献:

- [1] Willis J H, Capaldi R A, Huigsloot M, et al. Isolated deficiencies of OXPHOS complexes I and IV are identified accurately and quickly by simple enzyme activity immunocapture assays[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2009, 1787(5): 533-538.

相关系列产品:

- AC10158/AC10159 线粒体呼吸链复合体I活性检测试剂盒
- AC10565/AC10566 线粒体呼吸链复合体II活性检测试剂盒
- AC10567/AC10568 线粒体呼吸链复合体III活性检测试剂盒
- AC10311/AC10312 线粒体呼吸链复合体 V 活性检测试剂盒