

线粒体呼吸链复合体IV活性检测试剂盒

Mitochondrial Respiratory Chain Complex IV Activity Assay Kit

微量法

货号: AK203

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK203-A	100mL×1 瓶	-20℃保存;
AK203-B	20mL×1 瓶	-20℃保存;
AK203-C	1.5mL×1 瓶	-20℃保存;
AK203-D	10mL×2 瓶	4℃保存;
AK203-E	粉剂×2 支	-20℃保存;
AK203-F	粉剂×2 支	-20℃保存;

工作液的配制: 临用前将 AK203-E 和 AK203-F 各一支依次转移到一瓶 AK203-D 中混合溶解; 分批配制工作液是为了防止当天用不完, 导致工作液失效。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

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。

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。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

样品测定的前处理:

1. 准确称取0.1g 组织或收集500 万细胞, 加入1mL AK203-A 和10uL AK203-C, 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 AK203-B 和 2uL AK203-C, 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, 分光光度计蒸馏水调零。
2. 样本测定
 - (1) 工作液于37℃(哺乳动物)或25℃(其它物种)孵育5min。用不完的试剂 4℃可保存一周;
 - (2) 在微量玻璃比色皿或 96 孔板中加入 10μL 样本和 200μL 工作液, 混匀, 立即记录 550nm 处初始吸光值 A1 和 1min 后的吸光值 A2, 计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

注意: 若 ΔA 大于 0.4, 需将样本用 AK202-B 稀释适当倍数(计算公式中乘以相应稀释倍数), 使 A1-A2 小于 0.4, 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。

复合体IV活力单位的计算:

- a. 使用微量玻璃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。

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

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit (C05-02001)

(2) 按样本鲜重计算（检测样本数为 100T/48S）

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。

$$\text{复合体IV活力 1(U/g 质量)} = [\Delta A1 \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V \text{ 提取 1} \times V \text{ 样}) \div T = 1099 \times \Delta A1 \div W$$

$$\text{复合体IV活力 2 (U/g 鲜重)} = [\Delta A2 \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V \text{ 提取 2} \times V \text{ 样}) \div T = 220 \times \Delta A2 \div W$$

$$\text{复合体IV总活力 (U/g 质量)} = 1099 \times \Delta A1 \div W + 220 \times \Delta A2 \div W$$

注：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：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；T：反应时间，1 min； $\Delta A1$ ：上清测定值； $\Delta A2$ ：沉淀测定值；V 提取 1：加入提取液体积，1.01mL；V 提取 2：加入提取液体积，0.202mL。
Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g； 10^9 ：单位换算系数， $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。

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。

$$\text{复合体IV活力 (U/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 2198 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit (C05-02001)

(2) 按样本鲜重计算（检测样本数为 100T/48S）

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。

$$\text{复合体IV活力 1(U/g 质量)} = [\Delta A1 \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V \text{ 提取 1} \times V \text{ 样}) \div T = 2198 \times \Delta A1 \div W$$

$$\text{复合体IV活力 2(U/g 质量)} = [\Delta A2 \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V \text{ 提取 2} \times V \text{ 样}) \div T = 440 \times \Delta A2 \div W$$

$$\text{复合体IV总活力 (U/g 质量)} = 2198 \times \Delta A1 \div W + 440 \times \Delta A2 \div W$$

注：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，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；T：反应时间，1 min； $\Delta A1$ ：上清测定值； $\Delta A2$ ：沉淀测定值；V 提取 1：加入提取液体积，1.01mL；V 提取 2：加入提取液体积，0.202mL；
T：反应时间，1 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g； 10^9 ：单位换算系数， $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。