

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

可见分光光度法

货号: AK202

规格: 25T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK202-A	25mL×1 瓶	-20℃保存;
AK202-B	5mL×1 瓶	-20℃保存;
AK202-C	0.5mL×1 瓶	-20℃保存;
AK202-D	10mL×2 瓶	4℃保存;
AK202-E	粉剂×2 支	-20℃保存;
AK202-F	粉剂×2 支	-20℃保存;
工作液的配制: 临用前将 AK202-E 和 AK202-F 各一支依次转移到一瓶 AK202-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、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。

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 AK202-A 和10uL AK202-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 AK202-B 和 2uL AK202-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 1mL 玻璃比色皿中加入 40μL 样本和 800μL 工作液, 立即混匀, 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 0.2, 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 0.2, 可提高检测灵敏度。

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

此法需要自行测定样本蛋白浓度。

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

V 反总：反应体系总体积， 8.4×10^{-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，0.04mL；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， $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。

(2) 按样本质量计算（检测样本数为 25T/12S）

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

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

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

$\Delta A1$ ：上清测定值； $\Delta A2$ ：沉淀测定值 V；反总：反应体系总体积， 8.4×10^{-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，0.04 mL；V 提取 1：加入提取液体积，1.01 mL；V 提取 2：加入提取液体积，0.202 mL；T：反应时间，1 min；W：样本质量，g； 10^9 ：单位换算系数， $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$

注意事项：

最好采用新鲜样本进行测定，以准确反映该指标活力。