

## 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：**

- 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。
- 将匀浆 600g, 4℃离心 5min。
- 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g, 4℃离心 10min。
- 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）。
- 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：**

- 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。
- 样本测定
  - 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；
  - 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  $\Delta A$  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  $\Delta A$  小于 0.4，可提高检测灵敏度；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。

**复合体IV活力单位的计算：**

- 使用微量玻璃比色皿测定的计算公式如下：

- 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) =  $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1099 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

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。

复合体IV活力 1(U/g 质量) =  $[\Delta A_1 \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V \text{ 提取 } 1 \times V_{\text{样}}) \div T = 1099 \times \Delta A_1 \div W$

复合体IV活力 2 (U/g 鲜重) =  $[\Delta A_2 \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V \text{ 提取 } 2 \times V_{\text{样}}) \div T = 220 \times \Delta A_2 \div W$

复合体IV总活力 (U/g 质量) =  $1099 \times \Delta A_1 \div W + 220 \times \Delta A_2 \div W$

注：V 反总：反应体系总体积， $2.1 \times 10^{-4}$  L;  $\varepsilon$ ：细胞色素 C 摩尔消光系数， $1.91 \times 10^4$  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;  $\Delta A_1$ ：上清测定值;  
 $\Delta A_2$ ：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。  
 $C_{\text{pr}}$ ：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。

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

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。

复合体IV活力 1(U/g 质量) =  $[\Delta A_1 \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V \text{ 提取 } 1 \times V_{\text{样}}) \div T = 2198 \times \Delta A_1 \div W$

复合体IV活力 2 (U/g 质量) =  $[\Delta A_2 \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V \text{ 提取 } 2 \times V_{\text{样}}) \div T = 440 \times \Delta A_2 \div W$

复合体IV总活力 (U/g 质量) =  $2198 \times \Delta A_1 \div W + 440 \times \Delta A_2 \div W$

注：V 反总：反应体系总体积， $2.1 \times 10^{-4}$  L;  $\varepsilon$ ：细胞色素 C 摩尔消光系数， $1.91 \times 10^4$  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;  $\Delta A_1$ ：上清测定值;  
 $\Delta A_2$ ：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;  $C_{\text{pr}}$ ：样本蛋白质浓度，mg/mL; W：样本质量，g;  $10^9$ ：单位换算系数， $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。

**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。