



## 线粒体呼吸链复合体IV/细胞色素 C 氧化酶活性检测试剂盒说明书

微量法

**注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。**

货号：BC0945

规格：100T/96S

**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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 75 mL×2 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 33mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂三	粉剂×2 支	2-8℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：试剂放于试剂瓶内玻璃瓶中。临用前取 1 支加入 13.5mL 试剂一溶解，用不完的试剂-20℃分装保存 2 周，避免反复冻融；
- 2、试剂三：试剂置于试剂瓶内 EP 管中；临用前取 1 支加入 2mL 试剂一溶解，用不完的试剂-20℃保存 2 周，避免反复冻融；
- 3、工作液的配制：临用前取 0.5mL 试剂三加入到溶解好的 4.5mL 试剂二中混合备用（约 25T），或者按比例现用现配。

### 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/酶标仪、台式离心机、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/匀浆器/细胞超声破碎仪、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℃ 600g 离心 10min。
2. 将上清液移至另一离心管中，4℃ 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）。

- 在沉淀中加入 400 $\mu$ L 提取液，超声波破碎（功率 200W，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

- 可见分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至550nm，分光光度计蒸馏水调零。
- 根据样本量取出工作液于37 $^{\circ}$ C（哺乳动物）或25 $^{\circ}$ C（其它物种）孵育15min；
- 样本测定（在微量玻璃比色皿/96孔板中分别加入）

试剂名称（ $\mu$ L）	测定管	空白管
样本	10	-
蒸馏水	-	10
工作液	200	200

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  $\Delta A1 = A1$  测定管 - A2 测定管， $\Delta A2 = A1$  空白管 - A2 空白管， $\Delta A = \Delta A1 - \Delta A2$ 。空白管只需测定 1-2 次。

## 三、复合体IV活力单位的计算

### A、按微量玻璃比色皿计算：

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 prot)=[ $\Delta A \times V$ 反总  $\div (\epsilon \times d) \times 10^9$ ] $\div (V$ 样  $\times C$ pr) $\div T = 1099 \times \Delta A \div C$ pr

V反总：反应体系总体积，2.1 $\times 10^{-4}$ L； $\epsilon$ ：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，0.01mL； 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，1mol=10<sup>9</sup>nmol。

### B、按96孔板计算

将上述计算公式中的d-1cm改为d-0.6cm进行计算即可。

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 prot)=[ $\Delta A \times V$ 反总  $\div (\epsilon \times d) \times 10^9$ ] $\div (V$ 样  $\times C$ pr) $\div T = 1832 \times \Delta A \div C$ pr

V反总：反应体系总体积，2.1 $\times 10^{-4}$ L； $\epsilon$ ：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，0.6cm；

V样：加入样本体积，0.01mL； 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，1mol=10<sup>9</sup>nmol。

### 注意事项：

- 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 $\Delta A$ 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 $\Delta A$ 偏小，则可以通过增加加入的样本体积来提高灵敏度。
- 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）。
- 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100T/48S）

#### 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； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， $2.1 \times 10^{-4} \text{L}$ ； $\epsilon$ ：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； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01mL； $V_{\text{提取}}$ ：加入提取液体积，1.0mL； $W$ ：样本重量，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； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， $2.1 \times 10^{-4} \text{L}$ ； $\epsilon$ ：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； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01mL； $V_{\text{提取}}$ ：加入提取液体积，0.4mL。 $W$ ：样本重量，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）= $1099 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W + 440 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div W$

#### D、按96孔板计算：

将上述计算公式中的 $d=1\text{cm}$ 改为 $d=0.6\text{cm}$ 进行计算即可。

### 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，用微量玻璃比色皿  $\Delta A_2 = A_1 \text{ 空白管} - A_2 \text{ 空白管} = 0.7713 - 0.7669 = 0.0044$ ，上清液的  $\Delta A_1 = A_1 \text{ 测定管} - A_2 \text{ 测定管} = 0.7985 - 0.7754 = 0.0231$ ， $\Delta A_{\text{上清}} = \Delta A_1 - \Delta A_2 = 0.0231 - 0.0044 = 0.0187$ ，沉淀中的  $\Delta A_1 = A_1 \text{ 测定管} - A_2 \text{ 测定管} = 0.8843 - 0.7415 = 0.1428$ ， $\Delta A_{\text{沉淀}} = \Delta A_1 - \Delta A_2 = 0.1428 - 0.0044 = 0.1384$ ，按样本质量计算：

上清液中复合体IV活力(U/g 质量) =  $1099 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W = 1099 \times 0.0187 \div 0.1 = 205.513 \text{ U/g 质量}$

沉淀中复合体IV活力(U/g 质量) =  $440 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div W = 440 \times 0.1384 \div 0.1 = 608.96 \text{ U/g 质量}$

则样本复合体IV总活力（U/g 质量） =  $1099 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W + 440 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div W$

=  $1099 \times 0.0187 \div 0.1 + 440 \times 0.1384 \div 0.1 = 814.473 \text{ U/g 质量}$ 。

### 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 $\beta$ -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:**

- BC0510/BC0515 线粒体呼吸链复合体I活性检测试剂盒
- BC3230/BC3235 线粒体呼吸链复合体II活性检测试剂盒
- BC3240/BC3245 线粒体呼吸链复合体III活性检测试剂盒
- BC1440/BC1445 线粒体呼吸链复合体 V 活性检测试剂盒

**流程图:**

