

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。

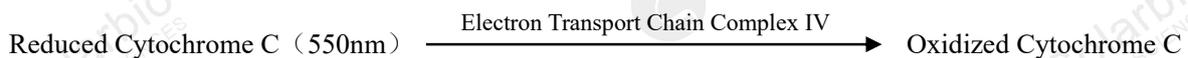
试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 75 mL×2 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 33mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂三	粉剂×2 支	2-8℃保存

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：试剂置于试剂瓶内玻璃瓶中；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。

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）。
4. 在沉淀中加入 400uL 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

- 1、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。
- 2、根据样本量取出工作液于37°C（哺乳动物）或25°C（其它物种）孵育15min；
- 3、样本测定（在微量玻璃比色皿/96孔板中分别加入）

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

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

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($\text{U}/\text{mg prot}$)= $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1832 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

V反总：反应体系总体积， $2.1 \times 10^{-4} \text{L}$ ； 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，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， $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

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。



$\Delta A_{\text{上清}}$: 上清测定值; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $2.1 \times 10^{-4} \text{L}$; 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 ; $V_{\text{样}}$: 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, $2.1 \times 10^{-4} \text{L}$; 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 ; $V_{\text{样}}$: 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 $\Delta A_2 = A_1$ 空白管 - A_2 空白管 = $0.7713 - 0.7669 = 0.0044$, 上清液的 $\Delta A_1 = A_1$ 测定管 - A_2 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 $\Delta A_1 = A_1$ 测定管 - A_2 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] Zhou N, Qi H, Liu J, Zhang G, Liu J, Liu N, Zhu M, Zhao X, Song C, Zhou Z, Gong J, Li R, Bai X, Jin Y, Song Y, Yin Y. Deubiquitinase OTUD3 regulates metabolism homeostasis in response to nutritional stresses. *Cell Metab.* 2022 Jul 5;34(7):1023-1041.e8. doi: 10.1016/j.cmet.2022.05.005. Epub 2022 Jun 7. PMID: 35675826.
- [2] Li C, Wu B, Li Y, Chen J, Ye Z, Tian X, Wang J, Xu X, Pan S, Zheng Y, Cai X, Jiang L, Zhao M. Amino acid catabolism regulates hematopoietic stem cell proteostasis via a GCN2-eIF2 伪 axis. *Cell Stem Cell.* 2022 Jul 7;29(7):1119-1134.e7. doi: 10.1016/j.stem.2022.06.004. PMID: 35803229.
- [3] Zhou Y, Tang J, Lan J, Zhang Y, Wang H, Chen Q, Kang Y, Sun Y, Feng X, Wu L, Jin H, Chen S, Peng Y. Honokiol alleviated neurodegeneration by reducing oxidative stress and improving mitochondrial function in mutant SOD1





cellular and mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Pharm Sin B*. 2023 Feb;13(2):577-597. doi: 10.1016/j.apsb.2022.07.019. Epub 2022 Aug 10. PMID: 36873166; PMCID: PMC9979194.

- [4] Xin J, Zhu B, Wang H, Zhang Y, Sun N, Cao X, Zheng L, Zhou Y, Fang J, Jing B, Pan K, Zeng Y, Zeng D, Li F, Xia Y, Xu P, Ni X. Prolonged fluoride exposure induces spatial-memory deficit and hippocampal dysfunction by inhibiting small heat shock protein 22 in mice. *J Hazard Mater*. 2023 Aug 15;456:131595. doi: 10.1016/j.jhazmat.2023.131595. Epub 2023 May 7. PMID: 37224709.

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

