Mitochondrial Respiratory Complex IV Activity Assay Kit

线粒体复合体IV/细胞色素 C 氧化酶(CCO)试剂盒说明书

货号：BN72606 | 方法：微板法 | 规格：48 样

一、产品简介：

线粒体复合体IV又称细胞色素 C 氧化酶（cytochrome-c oxidase，EC 1.9.3.1）（常用名为 CO，CcO，COX），是含血红素/铜终端氧化酶大家族的成员之一。它是所有原核和一些真核生物电子传递链上的终端金属膜蛋白酶，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。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 60mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂二	液体 10mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂三	液体μL×1 支	-20℃保存	
试剂四	粉剂×3 支	4℃保存；	用前甩几下或离心使粉剂落入底部，再加 1mL 蒸馏水溶解备用
试剂五	粉剂×1 支	4℃保存；	前甩几下或离心使粉剂落入底部，再加 1mL 蒸馏水溶解备用
试剂六	液体 8mL×1 瓶	4℃保存	

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、低温台式离心机、研钵、冰和蒸馏水。

四、线粒体复合体IV活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、线粒体制备（提示：整个线粒体的提取过程须保持 4℃低温环境）：

① 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细菌/细胞，加入 1mL 试剂一，用冰浴匀浆器或研钵匀浆，转移至离心管后于 4℃×700g 离心 10min（若漂浮有脂肪，可用枪头去除）。

② 弃沉淀，上清液移至另一离心管中，4℃×12000g 离心 10min。沉淀即为提取的线粒体，用作第④步操作。

③ (选做) 上步得到的上清液即为胞浆提取物，可作为样本用于测定从线粒体泄漏的线粒体呼吸链复合体IV，用于判断线粒体提取效果。

④ 在沉淀（线粒体）中加入200μL试剂二和2μL试剂三，超声波破碎（冰浴，功率20%或200W，超声3s，间隔10秒，重复30次），液体置于冰上**用于线粒体复合体IV酶活性测定。**

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取，或按照细菌/细胞数量（10^4）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 550nm。

② **反应 mix 的制备**:新 EP 管中依次加入 1mL 试剂四和 100μL 试剂五（试剂四：五=1mL：100μL），涡旋混匀 5min，室温避光放置 20min 后使用（仔细观察有颜色变化），一次性用不完可于-20℃避光保存。

③ 若待测上清液比较浑浊（蛋白浓度比较高），可先对样本进行梯度稀释或按照下方加样表梯度减少样本加样量（试剂六相应增加）进行预测定实验。

④ 将**反应** mix 和试剂六置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）于恒温振荡培养箱或水浴锅中孵育 15min；在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管
样本	20
试剂六	130
反应 mix	50
混匀，立即于 550nm 处读取 A1，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种），15min 后读取 A2，△A=A1-A2。	

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟氧化 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(nmol/min /mg prot)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(V1×Cpr)÷T=61.05×ΔA÷Cpr

2、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟氧化 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(nmol/min/g 鲜重)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(W×V1÷V)÷T=12.33×ΔA÷W

3、按细菌/细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌/细胞每分钟氧化 1nmol 还原型细胞色素 C 定义为一个酶活单位。

复合体Ⅳ活力(nmol/min/10^4 cell)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(500×V1÷V)÷T=0.025×ΔA

ε---还原型细胞色素 C 摩尔消光系数，21.84×10^3 L/mol/cm；d---96 孔板光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，0.202 mL；V1---加入样本体积，0.02mL；

V2---反应体系总体积，2×10^{-4} L；T---反应时间，15min；

W---样本质量，g；500--细胞或细菌总数，500 万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。