

线粒体复合体IV/细胞色素 C 氧化酶(CCO)试剂盒说明书

(货号: BP10493W-96 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 20mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂三	液体 1 支	-20℃避光保存	
试剂四	粉剂 3 支	-20℃避光保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 2mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	粉剂 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂六	液体 18mL×1 瓶	4℃保存	

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

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

(10⁴)：提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、检测步骤:

- 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:

试剂组分 (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， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

- 【注】 1. 若 A1 值小于 0.45，则可减少样本加样体积 (如 5μL，试剂六相应增加)，则改变后的加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。
2. 若 ΔA 的值在零附近徘徊，可以增加样本加样体积 (如 40μL，试剂六相应减少)，则改变后的加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。

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)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$] ÷ (V1 × Cpr) ÷ T = 61.05 × $\Delta A \div Cpr$

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)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$] ÷ (W × V1 ÷ V) ÷ T = 12.33 × $\Delta A \div W$

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/10⁴ cell)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$] ÷ (500 × V1 ÷ V) ÷ T = 0.025 × ΔA

ϵ ---还原型细胞色素 C 摩尔消光系数，21.84 × 10³ 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。