

细胞色素 c 氧化酶活性测定试剂盒产品说明书

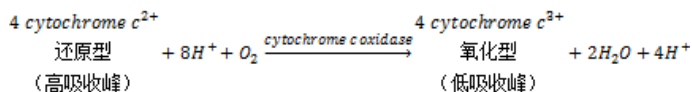
(货号: A090-1-1 比色法 20T)

主要用途

组织样品细胞色素 c 氧化酶活性测定试剂是一种旨在通过细胞色素 c 氧化酶反应系统中还原性细胞色素 c 氧化后吸光峰值的降低,即采用比色法测定样品中酶活性的权威而经典的技术方法。该技术经过精心研制、成功实验证明的。其适用于各种组织(动物、人体、昆虫等)裂解悬液中细胞色素 c 氧化酶的活性检测。产品严格无菌,即到即用,操作简捷,性能稳定。

技术背景

细胞色素 c 氧化酶 (Cytochrome c oxidase) 存在于真核生物的细胞线粒体上,主要通过氧化磷酸化为细胞提供能量。基于底物还原型细胞色素 c (reduced cytochrome c), 受到细胞色素 c 氧化酶的催化, 转化为氧化型细胞色素 c (oxidized cytochrome c), 在分光光度仪下, 出现吸光值的变化 (550nm 波长), 由此定量测定细胞色素 c 氧化酶的活性。细胞色素 c 氧化酶反应系统为:



产品内容: (试剂盒有效期 6 个月)

试剂组成	试剂功能	包装规格	保存条件
Reagent A	清理液	60mL	4℃
Reagent B	裂解液	10mL	-20℃
Reagent C	缓冲液	20mL	4℃
Reagent D	反应液	2mL	-20℃避光
Reagent E	稀释液	1mL	4℃
Reagent F1	稳定液 A	1 管	-20℃
Reagent F2	稳定液 B	250μL	-20℃

用户自备

1.5 毫升离心管: 用于反应液和样品制备的容器

15 毫升锥形离心管: 用于样品制备的容器

(微型) 台式离心机: 用于样品操作

比色皿: 用于比色的容器

分光光度仪: 用于比色分析

实验步骤

一、样品准备

1. 手术取出动物组织, 并称重以确定组织重量
2. (选择步骤) 放进预冷的 15 毫升锥形离心管
3. (选择步骤) 加入适量的 (500 毫克组织需要 3 毫升)

清理液 (Reagent A) 清洗 1 次

4. 移入到一个液氮冻存管
5. 即刻放进液氮罐过夜

6. 次日从液氮罐里取出, 即刻 (最快速度) 用研磨棒碾碎组织成粉末状 (注意: 切莫使组织冻融)
7. 放进一个 15 毫升锥形离心管
8. 加入预冷的 500 微升 **裂解液 (Reagent B)**
9. 转移到预冷的 1.5 毫升离心管
10. 强力涡旋震荡 30 秒, 充分混匀
11. 置于冰槽里孵育 30 分钟, 期间每 10 分钟强力涡旋震荡 30 秒 (注意: 如需暂时停止, 放进 -70℃ 冰箱里储存备用)
12. 放进 4℃ 微型台式离心机离心 5 分钟, 速度为 16000g (或 13000RPM)
13. 小心移取 500 微升上清液到新的预冷的 1.5 毫升离心管
14. 移取 10 微升进行蛋白定量检测 (注意: 建议使用 考马斯亮蓝蛋白质浓度定量试剂盒 A045-2)
15. 即刻放进 -70℃ 保存或置于冰槽里继续后续操作

二、测读准备

1. 准备好待测样品, 置于冰槽里融化
2. 设定好分光光度仪: 温度 25℃, 波长 550nm, 间隔 10 秒, 测读 7 次 (共 60 秒), 并置零或设置 0 秒和 60 秒各测读 1 次
3. 实验开始前, 将 -20℃ 冰箱里的试剂盒中的 **稳定液 B (Reagent F2)** 置入冰槽里融化, 然后移出 250 微升到 **稳定液 A (Reagent F1)** 管里, 混匀后, 标记为 **稳定工作液**, 置于冰槽里备用 (注意, 用完后即刻放回 -20℃ 冰箱里)。然后将 -20℃ 冰箱里的试剂盒中的 **反应液 (Reagent D)** 置入冰槽里融化, 然后移出 100 微升到新的 1.5 毫升离心管, 加入 3 微升 **稳定工作液**, 轻柔混匀后, 室温下避光静置至少 15 分钟 (可见颜色变化), 置于冰槽里, 标记为 **反应工作液** (注意: 参见 **注意事项 4**), 放在暗室里备用。然后进行下列操作
4. **缓冲液 (Reagent C)** 室温下均衡温度

三、背景对照测定

1. 移取 800 微升 **缓冲液 (Reagent C)** 到新的 1 毫升比色皿
2. 加入 100 微升 **稀释液 (Reagent E)**
3. 上下颠倒数次, 混匀
4. 室温下孵育 3 分钟
5. 放进分光光度仪, 置零
6. 取出比色皿, 加入 100 微升含有 **反应液 (Reagent D)** 和 **稳定液 (Reagent F)** 的 **反应工作液**
7. 上下颠倒数次, 混匀

8. 即刻放进分光光度仪检测，此为背景空对照（0 秒读数-60 秒读数），正常读数差值为 0.001 至 0.005

四、样品测定

1. 移取 800 微升 **缓冲液 (Reagent C)** 到新的比色皿
2. 加入 100 微升待测样品（注意：*建议总量 50 微克总蛋白，且样品需澄清*）
3. 上下颠倒数次，混匀
4. 室温下孵育 3 分钟
5. 放进分光光度仪，置零
6. 取出比色皿，加入 100 微升含有 **反应液 (Reagent D)** 和 **稳定液 (Reagent F)** 的 **反应工作液**
7. 即刻上下颠倒数次，混匀（限定在 3 秒之内）
8. 即刻放进分光光度仪检测，此为样品读数（0 秒读数-60 秒读数），通常活性读数差值为正数

五、计算样品活性

【(样品读数-背景读数)×1 (体系容量; 毫升)×样品稀释倍数】÷【0.1 (样品容量; 毫升)×21.84 (毫摩尔吸光系数×1 (反应时间; 分钟))] = 单位/毫升 ÷ (样品蛋白浓度) 毫克/毫升 = 单位/毫克
单位 = 微摩尔细胞色素 c/分钟

注意事项

1. 本产品为 20 次操作，包括背景对照
2. 操作时，须戴手套
3. 样品制备中忌用 DTT 和巯基乙醇等处理
4. 每增加 1 个样品，增加 **反应工作液** 为：**反应液 (Reagent D)** 100 微升 + **稳定工作液** 3 微升，以此类推。配制反应工作液时，须根据样本数量配制实际工作液容量。
5. 系统操作过程中，背景测定只需 1 次
6. 分光光度计波长严格设置在 550nm，误差 10nm 将不产生信号
7. 加样后 3 秒内进行比色测定
8. 比色测定后，比色皿须清洗彻底
9. 比色皿背景空对照 0 秒读数通常大于 0.2 为理想状态；建议使用比色皿测定
10. 背景空对照的正常读数差值（0 秒-60 秒）通常为 0.001 至 0.005（正负即可）
11. 样品 0 秒读数通常和背景空对照 0 秒读数一致
12. 样本测定 60 秒读数低于 0 秒读数表明具有酶活性
13. 酶活性单位浓度定义：在 25℃ 室温下，pH 7.0 的情况下，每单位酶在单位时间内（每分钟）氧化 1 微摩尔的细胞色素 c
14. 建议待测样本总蛋白浓度为 50 微克/100 微升；如果样本酶活性过低或过高，即 60 秒读数不变或为零，则可以增加或降低样本量（本公司提供考马斯亮蓝蛋白质浓度定量试剂盒 A045-2）