



# 线粒体呼吸链复合物 IV 活性比色法定量检测试剂盒产品说明书

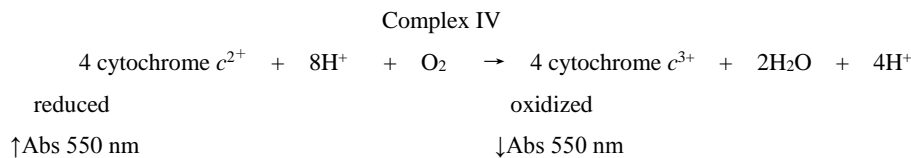
## (A089-4-1 21 管/20 样)

### 一、主要用途

线粒体呼吸链复合物 IV（细胞色素 C-氧化还原酶）活性比色法定量检测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。其适用于各种线粒体（动物、人体、酵母等）呼吸链复合物 IV 的活性检测。产品严格无菌，即到即用，活体检测，操作简捷，性能稳定。

### 二、技术背景

线粒体呼吸链复合物 IV（Mitochondria Complex IV），又称为细胞色素 C 氧化还原酶（cytochrome c oxidoreductase）或细胞色素 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。呼吸链复合物 IV 是由 13 种不同的亚体构成的复合物，其中含有 2 个血红素(heme)基团(a 和 a<sub>3</sub>)和 2 个铜原子，作为辅基(prosthetic groups)。呼吸链复合物 IV 的遗传变异导致氧化磷酸化类疾病，包括阿茨罕默综合症和肿瘤等。基于底物还原型细胞色素 C (reduced cytochrome c)，受到呼吸链复合物 IV 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），由此定量测定呼吸链复合物 IV 的活性。呼吸链复合物 IV 反应系统为：



### 三、产品内容

缓冲液（Reagent A）	20 毫升
反应液（Reagent B）	2 毫升
稀释液（Reagent C）	1 毫升
稳定液 A（Reagent D1）	1 管
稳定液 B（Reagent D2）	250 微升
产品说明书	1 份

### 四、保存方式

缓冲液（Reagent A）和稀释液（Reagent C）保存在 4℃ 冰箱里，其余的保存在 -20℃ 冰箱里；反应液（Reagent B）避免光照；有效保证 6 月

### 五、用户自备

比色皿：用于比色分析的容器



分光光度仪：用于比色分析

1.5 毫升离心管：用于反应液配制的容器

## 六、实验步骤

实验开始前，将-20℃冰箱里的试剂盒中的稳定液 B（Reagent D2）置入冰槽里融化，然后移出 250 微升到稳定液 A（Reagent D1）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 B）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 15 分钟（可见颜色变化），置于冰槽里，标记为反应工作液，放在暗室里。然后进行下列操作。

### （一）、测定准备

- 1、准备好含有复合物 IV 的样品，置于冰槽里
- 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、**缓冲液（Reagent A）** 室温下均衡温度

### （二）、背景对照测定

- 1、移取 800 微升**缓冲液（Reagent A）**到新的比色皿
- 2、加入 100 微升**稀释液（Reagent C）**
- 3、上下倾倒数次，混匀
- 4、室温静置 3 分钟
- 5、加入 100 微升含有**反应液（Reagent B）**和**稳定液（Reagent D）**的反应工作液
- 6、上下倾倒数次，混匀（限定在 3 秒之内）
- 7、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**

### （三）、样品活性测定

- 1、移取 800 微升**缓冲液（Reagent A）**到新的比色皿
- 2、加入 100 微升待测样品（注意：**建议总量 2 微克线粒体蛋白**）
- 3、上下倾倒数次，混匀
- 4、室温静置 3 分钟
- 5、加入 100 微升含有**反应液（Reagent B）**和**稳定液（Reagent D）**的反应工作液
- 6、上下倾倒数次，混匀（限定在 3 秒之内）
- 7、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），正常读数差值为正值**



#### （四）、计算样品活性

$$\frac{(\text{样本读数} - \text{背景读数}) \times \text{体系容量} (1\text{ml}) \times \text{样本稀释倍数}}{\text{样本容量} (0.1\text{ml}) \times 21.84 (\text{毫摩尔吸光系数}) \times \text{反应时间} (1\text{或者}5\text{分钟})} \cdot \frac{\text{样本蛋白浓度}}{(\text{mgprot/ml})}$$

单位：  $\mu\text{mol}$  细胞色素 C /min/mgprot

#### 七、注意事项

- 1、本产品为 20 次（10 个样本）操作，包括背景对照测定
- 2、操作时，须戴手套
- 3、系统操作过程中，背景测定只需 1 次
- 4、线粒体样品中忌用 DTT 和巯基乙醇等处理
- 5、线粒体样品检测前，须溶解；建议冻存融解（ $-70^{\circ}\text{C}$  至  $37^{\circ}\text{C}$ ）循环 3 次
- 6、如果增强酶活检测，建议使用线粒体复合物待测样品预处理试剂盒
- 7、加入样品启动反应后 3 秒内即刻比色测定
- 8、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）
- 9、样品 0 秒读数通常和背景空对照 0 秒读数一致
- 10、样本测定 60 秒读数低于 0 秒读数表明具有酶活性
- 11、比色测定后，比色皿须清洗彻底
- 12、建议待测样本线粒体蛋白浓度为 2 微克/100 微升；如果样本酶活性过低或过高，则可以增加或降低样本量；注意计算公式的调整（本公司提供线粒体溶解试剂盒为后续线粒体蛋白浓度测定的预处理试剂盒和 Bradford 蛋白质浓度定量试剂盒）
- 13、如果使用细胞或组织裂解悬液，则蛋白浓度为 50 微克/100 微升
- 14、线粒体呼吸链复合物 IV 酶活性单位浓度定义：在  $25^{\circ}\text{C}$  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
- 15、本公司提供系列线粒体及其酶类技术产品
- 16、每增加 1 个样品，增加反应工作液为：反应液（Reagent B）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
- 17、分光光度计波长严格设置在 550nm，误差 10nm 将不产生信号
- 18、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

#### 八、质量标准

本产品经鉴定性能稳定

本产品经鉴定检测准确