

线粒体复合体IV/细胞色素C氧化酶(CCO)试剂盒（微板法）

产品货号：BA2833

产品规格：48样

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。

产品内容：

产品名称	规格	保存条件	备注
试剂一	液体60mL×1瓶	-20℃	
试剂二	液体10mL×1瓶	-20℃	
试剂三	液体μL×1支	-20℃	
试剂四	粉剂×3支	2-8℃	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	2-8℃	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。
试剂六	液体8mL×1瓶	2-8℃	

所需的仪器和用品：

酶标仪、96孔板、可调式移液器、台式低温离心机、研钵、冰和蒸馏水。

线粒体复合体IV活性检测：

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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

- (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°C(哺乳动物)或25°C(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°C(哺乳动物)或25°C(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 小于0.01, 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。

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)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$] $\div$ (V1 $\times$ Cpr) $\div$ T=61.05 $\times$ $\Delta A \div$ 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定义为一个酶活为单位。

复合体IV活力(nmol/min/g 鲜重)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9 \div (W \times V1 \div V) \div T$]=12.33 $\times$ $\Delta A \div W$

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)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9 \div (500 \times V1 \div V) \div T$]=0.025 $\times$ ΔA 。

ϵ ---还原型细胞色素 C 摩尔消光系数, 21.84 $\times 10^3$ L/mol/cm; d---96 孔板光径, 0.5cm; V---加入提取液体积, 0.202mL; V1---加入样本体积, 0.02mL; V2---反应体系总体积, 2 $\times 10^{-4}$ 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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com