# 线粒体复合体Ⅳ试剂盒说明书

**微量法 100 管/96 样**

**注　　意** ：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

**测定意义：**

线粒体复合体Ⅳ又称细胞色素 C 氧化酶，也是线粒体呼吸电子传递链主路和支路的共有成分，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。

**测定原理：**

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。

**需自备的仪器和用品：**

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

**试剂的组成和配制：**

试剂一：液体 100mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂二：液体 20mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂三：液体 1.5mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂四：液体 20mL×1 瓶，4℃保存；

试剂五：粉剂×1 支，-20℃保存；

试剂六：粉剂×1 支，-20℃保存；

**样本的前处理：**

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离：

1、 准确称取 0.1g 组织或收集 500 万细胞，加入 1mL 试剂一和 10uL 试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。

2、 将匀浆 600g，4℃离心 5min。

3、 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11100g，4℃离心 10min。

4、 上清液即为除去线粒体的胞浆蛋白，可用于测定从线粒体泄漏的复合体Ⅳ（此步可选做）。

5、 步骤④中的沉淀即为线粒体，加入 200uL 试剂二和 2uL 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），用于复合体Ⅳ酶活性测定。

**测定步骤：**

1、 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 550nm，蒸馏水调零。

2、 样本测定

（1）工作液的配制：临用前将试剂五和试剂六依次转移到试剂四中混合溶解，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）孵育 5min；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。（2）在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 20μL 样本和 200μL 工作液，混匀，记录 550nm 处初始吸光值 A1 和 37℃反应 30min 后的吸光值 A2，计算 ΔA=A1-A2。

**注意点：**

1、 若 ΔA 大于 0.2，需将样本用试剂二稀释适当倍数（计算公式中乘以相应稀释倍数），使 A1-A2 小于 0.2，可提高检测灵敏度。

2、 动物肝脏样本由于酶活性过高， 1 分钟内吸光值就会到达平台期，务必先进行 2 个样本的预测定。可将样本用试剂二稀释 10~50 倍，反应时间缩到到 30 秒或 1 分钟（计算公式中代入实际反应时间，并乘以相应稀释倍数）。其他样本可按照正常测定步骤进行。

**复合体Ⅳ活力单位的计算：**

**a.使用微量石英比色皿测定的计算公式如下：**

（1） 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化降解 1 nmol 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×V 反总÷（ε×d）×$10^9$]÷(V 样×Cpr) ÷T=19.20×ΔA÷Cpr

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

（2） 按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织每分钟催化降解 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×V 反总÷（ε×d）×$10^9$]÷(W× V 样÷V 样总)÷T=3.88×ΔA÷W

（3） 按细菌或细胞密度计算

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化降解 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/$10^4$ cell)=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×$10^9$]÷(500×V 样÷V 样总)÷T=0.008×ΔA

V 反总：反应体系总体积，$2.2\times10^{-4}$ L；ε：细胞色素 C 摩尔消光系数，$1.91\times10^4$ L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.02 mL；V 样总：加入提取液体积，0.202 mL；T：反应时间，30 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万。

**b.使用 96 孔板测定的计算公式如下：**

（1） 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化降解 1 nmol 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×V 反总÷（ε×d）×$10^9$]÷(V 样×Cpr) ÷T=38.39×ΔA÷Cpr

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

（2） 按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织每分钟催化降解 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×V 反总÷（ε×d）×$10^9$]÷(W× V 样÷V 样总)÷T=7.76×ΔA÷W

（3） 按细菌或细胞密度计算

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化降解 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/$10^4$ cell)=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×$10^9$]÷(500×V 样÷V 样总)÷T=0.016×ΔA

V 反总：反应体系总体积，$2.2\times10^{-4}$ L；ε：细胞色素 C 摩尔消光系数，$1.91\times10^4$ L / mol /cm；d：96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.02 mL；V 样总：加入提取液体积，0.202 mL；T：反应时间，30 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万。