

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K837-M

产品规格: 48T(46 samples)/ 96T(94 samples)

检测仪器: 酶标仪(540-560 nm)

Elabscience®细胞线粒体呼吸链复合物IV (细胞色素 C 氧化酶)比色法测试盒

Cell Mitochondrial Complex IV (Cytochrome C Oxidase) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测细胞样本中线粒体复合物IV(细胞色素 c 氧化酶)的酶活。

检测原理

线粒体复合物IV又称为细胞色素 c 氧化酶, 是线粒体呼吸链上的主要酶之一, 将复合物III转换而来的还原型细胞色素 c 氧化成氧化型细胞色素 c, 同时消耗氧气生成水。线粒体复合物IV能够催化还原型细胞色素 c 氧化生成氧化型的细胞色素 c, 还原型细胞色素 c 在 550 nm 处有吸收波长。通过检测波长 550 nm 下吸光度下降的速率来计算酶活。

本试剂盒检测细胞样本时, 需测定总蛋白浓度, 推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extracting Solution)	25 mL×1 瓶	50 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	抑制剂 (Inhibitor)	0.8 mL×1 支	0.8 mL×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 (Substrate)	粉剂×2 瓶	粉剂×4 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	稳定剂 (Stabilizer)	粉剂×2 支	粉剂×4 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	缓冲液 (Buffer Solution)	13 mL×1 瓶	26 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板		
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明: 试剂严格按上表中的保存条件保存, 不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂, 使用前请先离心, 以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(540-560 nm，最佳检测波长 550 nm)

试剂准备

① 检测前，试剂一和五平衡至室温，试剂二、三和四放置于冰上待用。

② 试剂三工作液的配制：

每瓶试剂三加入4 mL试剂五溶解，避光待用，混匀分装后-20℃避光可保存1个月，避免反复冻融。

③ 试剂四工作液的配制：

每支试剂四加入200 μL试剂五溶解，避光待用，-20℃避光可保存1个月，避免反复冻融。

④ 反应工作液的配制：

根据用量，使用前将试剂三工作液：试剂四工作液按照体积比为2000：3的比例混匀，按需配制，15 min后使用，避光保存，4 h内使用有效。

样本准备

① 样本处理

细胞样本：收集 1×10^6 细胞样本加入0.2 mL试剂一，4 μ L试剂二，振荡混匀，超声破碎(冰浴，功率200 W，超声5 s，间隔10 s，重复15次)， $10000 \times g$ 低温离心10 min，弃沉淀取上清待测，留取部分上清用于蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.79-47.0 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
1×10^6 Jurkat 细胞	不稀释	1×10^6 HL-60 细胞	不稀释
4×10^6 CHO 细胞	不稀释	1×10^6 Hela 细胞	不稀释
1×10^6 K562 细胞	不稀释	1×10^6 293T 细胞	不稀释

注：样本稀释液为试剂一。

实验关键点

- ① 使用普通移液枪加样时，每次实验样本建议少于5个样本。
- ② 空白孔的平均变化值($\Delta A = A_1 - A_2$)应在 ± 0.005 以内，如果超过该范围，建议延长反应工作液的放置时间。

操作步骤

- ① 空白孔：取 40 μL 试剂一加入空白孔中。
测定孔：取 40 μL 待测样本加入测定孔中。
- ② 向步骤①中各孔依次加入 140 μL 的反应工作液。
- ③ 酶标仪于 550 nm 处分别测定反应开始 10 s 和 3 min 10 s 时的 OD 值 A_1 和 A_2 ，计算变化 OD 值 ΔA ($\Delta A = A_1 - A_2$)，空白孔的平均 ΔA 值应在 ± 0.005 以内。

操作表

	空白孔	测定孔
试剂一(μL)	40	--
待测样本(μL)	--	40
反应工作液(μL)	140	140
酶标仪 550 nm 处分别测定反应开始 10 s 和 3 min 10 s 时的 OD 值 A_1 和 A_2 ，计算变化 OD 值 ΔA ($\Delta A = A_1 - A_2$)，空白孔的平均 ΔA 值应在 ± 0.005 以内。		

本试剂盒检测细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

细胞样本中线粒体复合物IV酶活计算公式：

定义：室温条件下，每分钟每克线粒体蛋白氧化 1 μmol 的细胞色素 c 所需要的复合物IV酶量为一个酶活力单位。

$$\text{线粒体复合物IV酶活 (U/gprot)} = \frac{\Delta A_{550} \times V_1}{V_2 \times (\varepsilon \times d) \times T} \div C_{\text{pr}} \times f$$

注解：

ΔA_{550} ：测定孔 ΔA 值-空白孔 ΔA 值

V_1 ：反应体系总体积，0.18 mL

V_2 ：样本加入量，0.04 mL

ε ：还原型细胞色素 c 在 550 nm 处的摩尔吸光系数，0.0191 L/ $\mu\text{mol}/\text{cm}$

d：光径，0.5 cm

T：反应时间，3 min

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr} ：样本蛋白浓度，gprot/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.79-47.0 U/L	批间差	4.0-9.5 %
灵敏度	0.79 U/L	批内差	3.0-5.5 %
回收率	101-104 %		

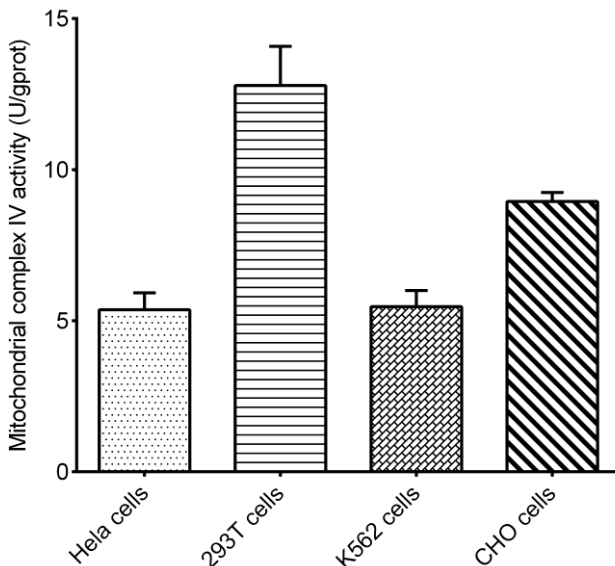
附录2 实例分析

例如检测Hela细胞(数据仅供参考):

取处理后的Hela细胞样本40 μL , 按操作表操作, 结果如下: 测定孔反应10 s时OD值 A_1 为0.680, 反应3 min 10 s后测定OD值 A_2 为0.624, 空白孔反应10 s时OD值 A_1 为0.623, 反应3 min 10 s后测定OD值 A_2 为0.625, Hela细胞样本中蛋白浓度为1.641 gprot/L计算结果为:

$$\text{线粒体复合物IV酶活 (U/gprot)} = \frac{((0.680 - 0.624) - (0.623 - 0.625)) \times 0.18}{0.04 \times 0.0191 \times 0.5 \times 3} \div 1.641 = 5.55 \text{ U/gprot}$$

按照说明书操作, 测定Hela细胞样本(1×10^6 个, 蛋白浓度为1.641 gprot/L, 加样量40 μL)、293T细胞样本(1×10^6 个, 蛋白浓度为1.044 gprot/L, 加样量40 μL)、K562细胞样本(1×10^6 个, 蛋白浓度为1.300 gprot/L, 加样量40 μL)和CHO细胞样本(4×10^6 个, 蛋白浓度为5.510 gprot/L, 加样量40 μL)中线粒体复合物IV活力(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
复孔差异大	样本加入量差异较大	减小样本量差异
	工作液加入时间差异较大	每次测定两个孔，减小工作液加入时间差，或使用排枪加入反应工作液。
样本测不出值	样本稀释倍数不合适或样本不新鲜	根据预实验结果选择合适样本稀释倍数
		选择新鲜样本测定
空白孔变化 OD 值 $>\pm 0.005$	工作液室温静置时间不足 15 min	工作液按照配制要求放置 15 min 后使用。
	加入工作液后未振板混匀	空白孔加入工作液后，振板混匀，减小误差。

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。