（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-K152-M

产品规格：48T(46 samples)/ 96T(94 samples)

检测仪器：酶标仪(540-560 nm)

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

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动物组织中线粒体复合物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。

本试剂盒检测组织样本时，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 A (Extracting Solution A)	50 mL×1 瓶	50 mL×2 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	提取液 B (Extracting Solution B)	25 mL×1 瓶	50 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	抑制剂 (Inhibitor)	1 mL×1 支	1 mL×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 (Substrate)	粉剂×2 瓶	粉剂×4 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	稳定剂 (Stabilizer)	粉剂×2 支	粉剂×4 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	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	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	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：无水乙醇，PBS(0.01 M，pH 7.4)

试剂准备

① 检测前，试剂一、二和六平衡至室温，试剂三、四和五放置于冰上待用。

② 试剂四工作液的配制：

每瓶试剂四加入4 mL试剂六溶解，避光待用，混匀分装后-20ºC避光可保存1个月，避免反复冻融。

③ 试剂五工作液的配制：

每支试剂五加入200 μL试剂六溶解，避光待用，-20ºC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，使用前将试剂四工作液：试剂五工作液按照体积比为2000：3的比例混匀，现配现用，按需配制，配好的反应工作液室温避光放置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

组织样本：组织用PBS（0.01 M，pH 7.4）清洗3次后使用滤纸吸干，称取0.1 g组织样本加入0.9 mL试剂一匀浆，4°C，600 × g离心5 min，上清转移到预冷的离心管中，11000 × g以上离心10 min，弃上清取沉淀，加入200 μL试剂二和10 μL试剂三，超声1 min，11000 × g离心，取上清待用，留取部分上清用于线粒体蛋白浓度测定。

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：4.10-250.00 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
10%大鼠肝组织	5-20	10%大鼠肾组织	5-20
10%大鼠脑组织	2-5	10%大鼠肺组织	2-5
10%大鼠脾组织	2-5	10%小鼠肝组织	5-20
10%小鼠肾组织	5-20	10%小鼠脑组织	2-5
10%小鼠肺组织	2-5	10%小鼠脾组织	2-5

注：样本稀释液为试剂二。

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($\triangle A=A_1-A_2$)应在± 0.005 以内。

操作步骤

① 空白孔：取 20 μL 试剂二加入空白孔中。

测定孔：取 20 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 反应工作液，振板 3 s。

③ 酶标仪 550 nm 处分别测定反应开始 10 s 和 70 s 时的 OD 值 A_1 和 A_2，计算变化 OD 值△A (△A = A_1- A_2)，空白孔的平均△A 值应在± 0.005 以内。

操作表

	空白孔	**测定孔**
试剂二(μL)	20	--
待测样本(μL)	--	20
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 70 s 时的 OD 值 A_1 和 A_2，计算变化 OD 值△A (△A = A_1- A_2)，**空白孔的平均△A 值应在± 0.005 以内。**		

本试剂盒检测线粒体样本时，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

组织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 g 组织中线粒体蛋白氧化 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。

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

注解：

ΔA_{550}：测定孔△A 值-空白孔△A 值

V_1：反应体系总体积：0.16 mL

V_2：样本加入量：0.02 mL

ε：还原型细胞色素 c 在 550 nm 处的摩尔吸光系数：0.0191 L/μmol/cm

d：光径，0.5 cm

T：反应时间：1 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	4.10-250.00 U/L	**批间差**	6.3-9.5 %
灵敏度	4.10 U/L	**批内差**	3.2-5.0 %
稀释回收率	95-104 %		

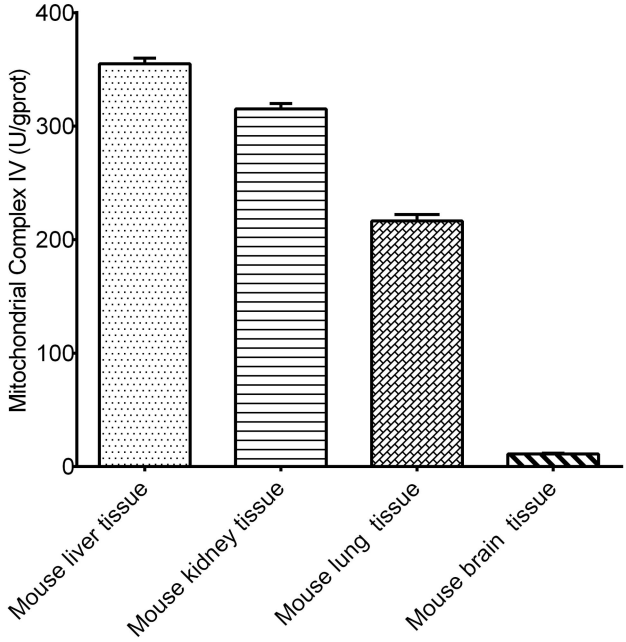
附录 2 实例分析

例如检测大鼠肝组织(数据仅供参考)：

取20 μL稀释10倍的10%小鼠肝组织线粒体上清液，按操作表操作，结果如下：测定孔反应10 s时OD值A_1为0.916，反应70 s后测定OD值A_2为0.760，空白孔反应10 s时OD值A_1为0.924，70 s后测定OD值A_2为0.920，10%小鼠肝组织中线粒体蛋白浓度为3.54 gprot/L计算结果为：

$$\text{线粒体复合物Ⅳ酶活 (U/gprot)} = \frac{((0.916 - 0.760) - (0.924-0.920)) \times 0.16}{0.02 \times 0.0191 \times 0.5 \times 1} \div 3.54 \times 10 = 359.7\ \text{U/gprot}$$

按照说明书操作，测定10%小鼠肝组织(线粒体蛋白浓度为3.54 gprot/L，稀释10倍，加样量20 μL)、10%小鼠肾组织(线粒体蛋白浓度为6.49 gprot/L，稀释10倍，加样量20 μL)、10%小鼠肺组织(线粒体蛋白浓度为3.17 gprot/L，稀释5倍，加样量20 μL)和10%小鼠脑组织(线粒体蛋白浓度为2.37 gprot/L，稀释5倍，加样量20 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>±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。

附录4 客户发表文献

1. Tian Y, Hong X, Xie Y, et al. 17β-Estradiol (E2) Upregulates the ERα/SIRT1/PGC-1α Signaling Pathway and Protects Mitochondrial Function to Prevent Bilateral Oophorectomy (OVX)-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)[J]. Antioxidants, 2023, 12(12): 2100.

2. Gu W, Cong X, Pei Y, et al. Impaired Mitochondrial Energy Metabolism Regulated by p70S6K: A Putative Pathological Feature in Alzheimer's Disease[J]. Metabolites, 2024, 14(7): 369.

3. Xiao P, Wu S, Wang Z, et al. Biotoxicity of paraquat to lung cells mediated by endoplasmic reticulum-mitochondria interaction[J]. Journal of Molecular Histology, 2024, 55(6): 1063-1077.

4. Chen L, Chen S, Bai Y, et al. Electroacupuncture improves cognitive impairment after ischemic stroke based on regulation of mitochondrial dynamics through SIRT1/PGC-1α pathway[J]. Brain Research, 2024, 1844: 149139.

5. Fu R, Guo X, Pan Z, et al. Molecular mechanisms of AMPK/YAP/NLRP3 signaling pathway affecting the occurrence and development of ankylosing spondylitis[J]. Journal of Orthopaedic Surgery and Research, 2023, 18(1): 831.

6. Kaur S, Ahuja P, Kapil L, et al. Coenzyme Q10 ameliorates chemotherapy-induced cognitive impairment in mice: a preclinical study[J]. Molecular Biology Reports, 2024, 51(1): 930.