

## 细胞色素 c 氧化酶检测试剂盒

### 细胞色素 c 氧化酶检测试剂盒

细胞色素 c 氧化酶分析试剂盒，用于测定溶解的及与线粒体膜结合的细胞色素 c 氧化酶。所有动物、植物、酵母及细菌的需氧代谢中，细胞色素 c 氧化酶的末端与氧有高亲和力。细胞色素 c 氧化酶定位于线粒体内膜，为膜的标记物。

试剂盒可用于检测细胞色素 c 氧化酶的活性，也可用于检测线粒体外膜的完整性。推荐使用线粒体分离试剂盒 (CC091) 分离线粒体，可从动物组织中轻松、快捷的获得线粒体。

该试剂盒足够 100 次检测使用。

### 试剂准备

所有试剂均使用超纯水(电阻率 $\geq 18 \text{ M}\Omega \times \text{cm}$ ,  $25^\circ\text{C}$ )配制。

1. 酶稀释工作液：将 1 管十二烷基- $\beta$ -D-麦芽糖苷溶解于 2mL 酶稀释缓冲液中。
2. 亚铁细胞色素 c 底物溶液：将 1 管细胞色素 c 溶解于 0.74mL 蒸馏水中，再加入  $3.7\mu\text{L}$  0.1M DTT，混合后，静置 15min。溶液的颜色会从暗橙色变为淡紫红色。用分析缓冲液将其稀释 20 倍(将  $10\mu\text{L}$  加入至  $190\mu\text{L}$  分析缓冲液中)后测量 A550/A565 的比率，用分析缓冲液调零。A550/A565 的比率应该在 10~20。

注意：如果 A550/A565 的比率低于 10，底物未充分还原，酶的活性是无效的。

### 实验流程

#### 一 细胞色素 c 氧化酶活性测定

1. 在酶标仪上设定，检测波长为 550nm。使用动力学程序：5 秒延迟；10 秒间隔；6 次读数。其中波长是非常关键的参数，偏差不能超过 2nm，如果有 10nm 偏差，无法检测到信号。
2. 试剂的加入如表 1 所示，总反应体积为  $220\mu\text{L}$ 。

表 1

样本	分析缓冲液	酶稀释缓冲液	样本	亚铁细胞色素 c 底物溶液
空白对照	$190\mu\text{L}$	$20\mu\text{L}$	-	$10\mu\text{L}$
待测样本	$190\mu\text{L}$	$(20-x)\mu\text{L}$	$x\mu\text{L}$	$10\mu\text{L}$

3. 将  $190\mu\text{L}$  分析缓冲液加入 96 孔板中。
4. 加入  $(20-x)\mu\text{L}$  酶稀释缓冲液，再加入  $x\mu\text{L}$  待测样本（线粒体悬浮液），颠倒混匀。
5. 用 8 通道加样器加入  $10\mu\text{L}$  亚铁细胞色素 c 底物溶液，吹打混匀。
6. 由于酶反应的速度非常快，立即在 550nm 处读数。
7. 期望的背景值为 A550/minute: 0.001~0.005。
8. 计算样本的活性

单位定义：在  $25^\circ\text{C}$ ，pH 7.0 下，1 单位酶可在 1min 之内将  $1\mu\text{M}$  亚铁细胞色素 c 氧化。

$$\text{Units/ml} = [\Delta A/\text{min} \times \text{样本稀释倍数} \times 220\mu\text{L}(\text{总体积})] / [\text{样本的体积}(\mu\text{L}) \times 21.84]$$

$$\Delta A/\text{min} = A/\text{minute}(\text{sample}) - A/\text{minute}(\text{blank})$$

21.84：在 550nm 处，亚铁细胞色素 c 与高铁细胞色素 c 之间消光系数的差异。

#### 二 测量线粒体外膜的完整性

线粒体膜的完整性依赖于其制备方法。一些组织较难均浆，剪切力可能会导致量大的线粒体外膜损伤。在不同的组织中，线粒体外膜的损失程度列于表 2。推荐使用新鲜制备的组织。

表 2 不同组织的线粒体外膜的损失程度

组织	% 线粒体外膜的损失	组织	% 线粒体外膜的损失
大鼠肝脏	5-10%	大鼠肾脏	22%
大鼠心脏	20-44%	兔心脏	16%
大鼠脑	8-30%	牛心脏	16%

注意：适用于线粒体悬液，不需要进一步纯化。

1. 用酶稀释缓冲液（完整线粒体上的细胞色素 c 氧化酶活性）及酶稀释工作液（总细胞色素 c 氧化酶活性）分别稀释线粒体样本，使其浓度为 0.1~0.2mg protein/mL。
2. 检测前，在 2~8°C 下，至少孵育 10min。
3. 取 1~2μg 线粒体蛋白，用于细胞色素 c 氧化酶活性的测定（按照一. 1~8 步进行操作）。

4. 测定每个样本的  $\Delta A_{550}/\text{minute}$

$$\Delta A(\text{intact}) = \Delta A(\text{intact sample}) - \Delta A(\text{blank})$$

$$\Delta A(\text{total}) = \Delta A(\text{total sample}) - \Delta A(\text{blank})$$

5. 计算线粒体的完整性：线粒体外膜的损失% =  $(\Delta A(\text{total}) - \Delta A(\text{intact})) \times 100 / \Delta A(\text{total})$

#### 注意事项

1. 用户需自备二硫苏糖醇溶液。
2. 检测波长是非常关键的，偏差最多 2nm。如果偏差 10nm，会检测不到信号。
3. 在每次反应中，细胞色素 c 氧化酶的活性单位在 0.4~4mU 之间，可得到最佳结果。对于待测样本，建议做不同倍数的稀释后进行检测，确保读数在线性范围之内。可同时加入细胞色素 c 氧化酶作为阳性对照(0.01U~0.2U/mL)（用户自备），可加入 20~40μL，加入的总量为 0.4~4mU，最后用酶稀释缓冲液补至 100μL。

#### 温馨提示

为了您的自身安全，使用试剂前，请做好防护，如穿实验服，带手套等。

#### 储存温度

-20°C 保存。

#### 包装清单

货号	品名	包装
HT022A	分析缓冲液	25mL
HT022B	酶稀释缓冲液	10mL
HT022C	细胞色素 c	1 管×2
HT022E	十二烷基-β-D-麦芽糖苷	1 管×2
	说明书	1 份

#### 相关产品

产品编号	产品名称	产品规格
CC091	细胞线粒体分离试剂盒	50~100 次
CC092	组织线粒体分离试剂盒	50~100 次
CC093	酵母线粒体分离试剂盒	50~100 次
WB040	改良型线粒体分离试剂盒	50~100 次
HT022	细胞色素 c 氧化酶检测试剂盒	100 次
HT021	线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)	100 次