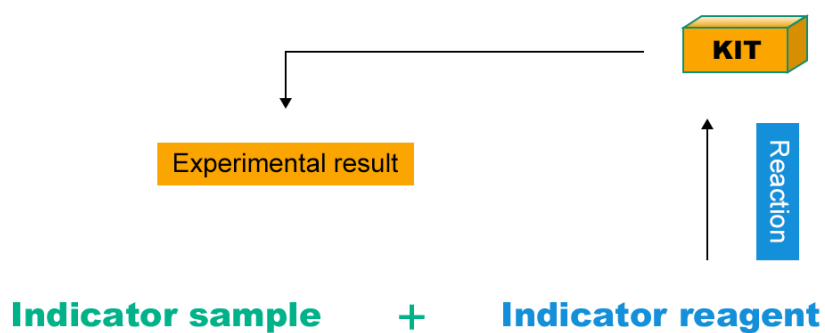


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0483

Size: 100T/96S

线粒体呼吸链复合体III检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义：

线粒体复合体III (EC 1.10.2.2) 又称 CoQ-细胞色素 C 还原酶, 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞的线粒体中, 是线粒体呼吸电子传递链主路和支路的共有成分, 负责把还原型 CoQ 的氢传递给细胞色素 C, 生成还原型细胞色素 C。

二、测定原理：

与氧化型细胞色素 C 不同, 还原型细胞色素 C 在 550nm 有特征光吸收, 因此 550nm 光吸收增加速率能够反映线粒体复合体III酶活性。

三、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。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
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 支	-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	液体 2.5mL×1 瓶	-20℃保存	

五、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 III（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 III 酶活性测定。

六、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：将试剂五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 4℃可保存一周；

（2）在微量石英比色皿或 96 孔板中依次加入 10 μL 样本、200 μL 工作液和 25 μL 试剂六，立即混匀，记录 550nm 处初始吸光值 A1 和 2min 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

七、复合体 III 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产生 1nmol 还原型细胞色素 C 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{复合体 III 活力 (nmol/min /mg prot)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 615 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}\end{aligned}$$

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组织每分钟催化产生1nmol还原型细胞色素C定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体III活力 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 124 \times \Delta A \div W$$

(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产生1nmol还原型细胞色素C定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体III活力 (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ T = 0.248 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 2.35×10^{-4} L; ϵ : 细胞色素C摩尔消光系数, 1.91×10^4 L/mol /cm; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.01 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 0.202 mL; T : 反应时间, 2 min; C_{pr} : 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产生1nmol还原型细胞色素C定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体III活力 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ = 1230 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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组织每分钟催化产生1nmol还原型细胞色素C定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体III活力 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ \div T = 248 \times \Delta A \div W$$

(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产生 1nmol 还原型细胞色素 C 定义为一个酶活力单位。

复合体 III 活力 (nmol/min/ 10^4 cell) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$
 $T = 0.496 \times \Delta A$

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， 2.35×10^{-4} L； ϵ ：细胞色素 C 摩尔消光系数， 1.91×10^4 L/mol / cm； d ：96 孔板光径，0.5cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，0.202mL； T ：反应时间，2min； C_{pr} ：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。