

线粒体复合体 III/CoQ-细胞色素 C 还原酶试剂盒说明书

(货号: BP10491W 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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。

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

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 100mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂三	液体 1 支	-20°C 避光保存	
试剂四	液体 2 瓶	4°C 保存	
试剂五	粉剂 2 支	-20°C 避光保存	1. 使用前把一支试剂五全部转移至一瓶试剂四中, 混匀溶解后备用; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂六	液体 2mL×1 支	-20°C 避光保存	

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、线粒体制备 (提示: 整个线粒体的提取过程须保持 4°C 低温环境):

- ① 称取约 0.2g 组织或收集 500 万细菌/细胞, 加入 1mL 试剂一, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆, 转移至离心管后于 4°C×700g 离心 10min (若漂浮有脂肪, 可用枪头去除)。
- ② 弃沉淀, 上清液移至另一离心管中, 4°C×12000g 离心 10min。沉淀即为提取的线粒体, 用作第④步操作。
- ③ (选做) 上步得到的上清液即为胞浆提取物, 可作为样本用于测定从线粒体泄漏的线粒体呼吸链复合体 III, 用于判断线粒体提取效果。
- ④ 在沉淀 (线粒体) 中加入 200μL 试剂二和 2μL 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), 液体置于冰上用于线粒体复合体 III 酶活性测定。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取, 或按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 550nm。
- ② 若待测上清液比较浑浊 (蛋白浓度比较高), 可先对样本进行梯度稀释或按照下方加样表梯度减少样本加样量 (试剂六相应增加) 进行预测定实验。

- ③ 将试剂五和六置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）于恒温振荡培养箱或水浴锅中孵育 15min；在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管
样本	20
试剂五	170
试剂六	10
混匀，于 550nm 处读取 A1，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种），5min 后读取 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】若 ΔA 的值在零附近徘徊，可以增加样本加样体积 V1（如 40μL，试剂五相应减少），或延长反应时间 T（如增至 10min 或更长），则改变后的 V1 和 T 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

定义：每毫克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。

$$\text{复合体III活力}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 183.15 \times \Delta A \div Cpr$$

2、按样本鲜重计算：

定义：每克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。

$$\text{复合体III活力}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 183.15 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌/细胞密度计算：

定义：每 1 万个细菌/细胞每分钟催化产生 1nmol 还原型细胞色素 C 定义为一个酶活单位。

$$\text{复合体III活力}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.366 \times \Delta A$$

ϵ ---还原型细胞色素 C 摩尔消光系数， $21.84 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；d---96 孔板光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，0.202 mL；

V1---加入样本体积，0.02mL；

V2---反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

T---反应时间，5min；

W---样本质量，g；

500---细胞或细菌总数，500 万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。