

线粒体复合体III试剂盒说明书

微量法 100管/96样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

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。

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。

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。

试剂的组成和配制：

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；

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，11000g，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。

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；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

（2）在微量石英比色皿或96孔板中加入10μL样本、25μL试剂六和200μL工作液，立即混匀，记录550nm处初始吸光值A1和2min后的吸光值A2，计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

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1 nmol 还原型细胞色素C定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体III活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 615 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{复合体III活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 124 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{复合体III活力}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.248 \times \Delta A$$

V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样: 加入样本体积, 0.01 mL; V样总: 加入提取液体积, 0.202 mL; T: 反应时间, 2 min; Cpr: 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1 nmol 还原型细胞色素C定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体III活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1230 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{复合体III活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 248 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{复合体III活力}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.496 \times \Delta A$$

V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样: 加入样本体积, 0.01 mL; V样总: 加入提取液体积, 0.202 mL; T: 反应时间, 2 min; Cpr: 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。

