

线粒体复合体III试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

注 意：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 10 μ L 样本、25 μ L 试剂六和 200 μ L 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 $\Delta A = A2 - A1$ 。

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。

$$\text{复合体III活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T = 615 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

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

(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。

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

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。

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

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。

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

(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。

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

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。