

线粒体复合体III活性测定试剂盒说明书

(微板法 48 样)

一、产品简介：

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：

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|------|--------------|--------|---------------------------|
| 试剂一 | 液体 60mL×1 瓶 | -20℃保存 | |
| 试剂二 | 液体 10mL×1 瓶 | -20℃保存 | |
| 试剂三 | 液体μL×1 瓶 | -20℃保存 | |
| 试剂四 | 液体×1 瓶 | -20℃保存 | |
| 试剂五 | 粉剂×1 支 | -20℃保存 | 用前把试剂五全部转移至试剂四中, 混匀溶解后备用。 |
| 试剂六 | 液体 0.5mL×1 支 | -20℃保存 | |

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、低温台式离心机、研钵、冰和蒸馏水。

四、线粒体复合体III活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、线粒体制备 (提示: 整个线粒体的提取过程须保持 4℃低温环境):

- ① 称取约 0.1g 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℃×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℃×12000g 离心 10min。用移液器移除上清液, 留下沉淀 (沉淀即为线粒体)。
- ③ 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、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30min 以上, 设定温度 25℃, 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 所有试剂解冻至室温 (25℃), 在 96 孔板中依次加入:

| 试剂名称 (μL) | 测定管 |
|---------------------------|-----|
| 样本 | 20 |
| 试剂五 | 170 |
| 试剂六 | 10 |
| 混匀, 25℃下, 于 550nm 处读取 A1, | |

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 40 μ L, 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。

复合体III活力(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。

复合体III活力(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 定义为一个酶活力单位。

复合体III活力(nmol/min/ 10^4 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, 21.84×10^3 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, 2×10^{-4} 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。