

线粒体呼吸链复合体III/CoQ-细胞色素 C 还原酶活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC3245

规格：100T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 80 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 10mL×2 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂三	液体 1.5 mL×1 支	2-8℃保存

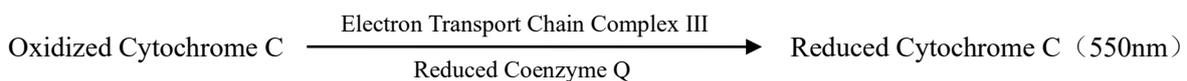
溶液的配制：

1. 工作液的配制：临用前取 1 支试剂二转移到 1 瓶试剂一中混合溶解（约 62T），用不完的试剂-20℃分装保存 2 周，避免反复冻融。

产品说明：

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。

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。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

实验所需仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板（非聚苯乙烯材质）、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

- 1、称取约0.1g组织或收集500万细胞，加入1.0 mL提取液，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 2、4℃ 600 g离心10min。将上清液移至另一离心管中，4℃ 11000 g离心15min。
- 3、上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的复合体III（此步可选做，可以判断线粒体提取效果）。
- 4、在沉淀中加入200μL提取液，超声波破碎（功率200W，超声5秒，间隔10秒，重复15次），用于复合体III酶活性测定，并且用于蛋白含量测定。

二、测定步骤

- 1、可见分光光度计/酶标仪预热30min 以上，调节波长至550nm，分光光度计蒸馏水调零。
- 2、操作表：在微量玻璃比色皿或96孔板中分别加入

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
工作液	160	160
试剂三	20	-
37°C (哺乳动物) 或25°C (其它物种) 准确孵育2min, 之后分别加入		
样本	20	20
蒸馏水	-	20
立即混匀, 记录550nm处初始吸光值A1和 2min 的吸光值A2, 分别记为A1测定、A2测定, A1对照、A2对照。计算 $\Delta A = (A2_{测定} - A1_{测定}) - (A2_{对照} - A1_{对照})$ 。每个测定管需设置一个对照管。		

三、复合体III活力单位的计算

1、按微量玻璃比色皿计算:

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。

复合体III活力(U/mg prot)=[$\Delta A \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (Cpr \times V_{样}) \div T = 262 \times \Delta A \div Cpr$

V反总: 反应体系总体积, $2 \times 10^{-4}L$; ϵ : 细胞色素C摩尔消光系数, $1.91 \times 10^4 L/mol/cm$; d: 比色皿光径, 1cm;

V样: 加入样本体积, 0.02mL; T: 反应时间, 2min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; 10^9 : 单位换算系数, $1mol = 10^9nmol$ 。

2、按96孔板计算:

将上述公式中的d-1cm 改为d-0.6cm 进行计算即可。

注意事项:

- 1、尽量保持比色皿内反应液温度在 37°C或 25°C。可以在记录初始吸光度 A1 后迅速将比色皿连同反应液一起放入 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴中准确反应 2 分钟, 之后迅速取出比色皿并擦干, 记录 2min 时的吸光度。
- 2、当测定吸光值大于 1 时, 建议将样本用提取液稀释后测定, 计算公式中注意乘以稀释倍数。
- 3、此法需要自行测定样本蛋白质浓度。
- 4、由于提取液中含有一定浓度的蛋白 (约 1mg/mL), 所以在测定样本蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白含量(单独测定)。
- 5、推荐使用样本蛋白浓度计算酶活, 若用样本质量计算, 则需加测胞浆提取物酶活, 上清和沉淀酶活之和方为总酶活。
- 6、本试剂盒试剂足够完成 100 管反应。
- 7、附:使用样本重量计算公式: (样本检测数为 100T/24S)

A、上清中复合体III活力的计算:

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。

复合体III活力(U/g 质量)=[$\Delta A1 \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (W \div V_{提取} \times V_{样}) \div T = 262 \times \Delta A1 \div W$

$\Delta A1$: 上清测定值; V反总: 反应体系总体积, $2 \times 10^{-4}L$; ϵ : 细胞色素C摩尔消光系数, $1.91 \times 10^4 L/mol/cm$; d: 比色皿光径, 1cm; V样: 加入样本体积, 0.02mL; V提取: 加入提取液体积, 1.0mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 2min; 10^9 : 单位换算系数, $1mol = 10^9nmol$ 。

B、沉淀中复合体III活力的计算:

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。

复合体III活力(U/g 质量)=[$\Delta A_2 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 52 \times \Delta A_2 \div W$

ΔA_2 : 沉淀测定值; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $2 \times 10^4 \text{L}$; ϵ : 细胞色素C摩尔消光系数, $1.91 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.02mL; $V_{\text{提取}}$: 加入提取液体积, 0.2mL; W : 样本质量, g; T : 反应时间, 2min; 10^9 : 单位换算系数, $1 \text{mol} = 10^9 \text{nmol}$ 。

C、样本复合体III总活力的计算:

样本复合体III总活力即为上清中复合体III活力与沉淀中复合体III活力之和。

复合体III (U/g 质量) = $262 \times \Delta A_1 \div W + 52 \times \Delta A_2 \div W$

D、以96孔板计算:

将上述公式中的 $d=1\text{cm}$ 改为 $d=0.6\text{cm}$ 进行计算即可。

实验实例:

1. 取 0.1g 兔子肾脏进行样本处理, 将复溶后的沉淀稀释 2 倍后按照测定步骤操作, 使用微量玻璃比色皿测得计算 $\Delta A = (A_2 \text{ 测定} - A_1 \text{ 测定}) - (A_2 \text{ 对照} - A_1 \text{ 对照}) = (0.9921 - 0.9077) - (0.9664 - 0.9419) = 0.0599$, 按样本蛋白浓度计算得:

复合体III (U/mg prot) = $262 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \times 2$ (稀释倍数) = $262 \times 0.0599 \div 2.56 \times 2$ (稀释倍数) = 12.26 U/mg prot。

相关发表文献:

[1] Ming Song, Fangfang Chen, Yihui Li, et al. Trimetazidine restores the positive adaptation to exercise training by mitigating statin-induced skeletal muscle injury. Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle. November 2017; (IF10.754)

[2] Liuqin He, Haiwen Zhang, Xihong Zhou. Weanling Offspring of Dams Maintained on Serine-Deficient Diet Are Vulnerable to Oxidative Stress. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. September 2018; (IF4.868)

[3] Qiuli OuYang, Nengguo Tao, Miaoling Zhang. A Damaged Oxidative Phosphorylation Mechanism Is Involved in the Antifungal Activity of Citral against Penicillium digitatum. Frontier in Immunology. February 2018; (IF4.259)

[4] Wang M, Zhang Y, Xu M, et al. Roles of TRPA1 and TRPV1 in cigarette smoke-induced airway epithelial cell injury model[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2019, 134: 229-238.

[5] Bao Z, Xu X, Chao H, et al. ERK/Nrf2/HO-1 pathway-mediated mitophagy alleviates traumatic brain injury-induced intestinal mucosa damage and epithelial barrier dysfunction[J]. 2017.

参考文献:

[1] Luo C, Long J, Liu J. An improved spectrophotometric method for a more specific and accurate assay of mitochondrial complex III activity[J]. Clinica Chimica Acta, 2008, 395(1-2): 38-41.

相关系列产品:

BC0510/BC0515 线粒体呼吸链复合体I活性检测试剂盒

BC3230/BC3235 线粒体呼吸链复合体II活性检测试剂盒

BC0940/BC0945 线粒体呼吸链复合体IV活性检测试剂盒

BC1440/BC1445 线粒体呼吸链复合体V活性检测试剂盒