

## 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 10 $\mu$ L 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 200 $\mu$ L 试剂二和 2 $\mu$ L 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  $\mu$  L 样本、25  $\mu$  L 试剂六和 200  $\mu$  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  $\Delta A=A_2-A_1$ 。

**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。

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

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

复合体III活力(nmol/min/ $10^4$  cell)=[ $\Delta A \times V$  反总  $\div (\epsilon \times d) \times 10^9$ ] $\div (500 \times V$  样  $\div V$  样总) $\div T=0.248 \times \Delta A$   
V 反总：反应体系总体积， $2.35 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：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，0.01 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。

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

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

复合体III活力(nmol/min/ $10^4$  cell)=[ $\Delta A \times V$  反总  $\div (\epsilon \times d) \times 10^9$ ] $\div (500 \times V$  样  $\div V$  样总) $\div T=0.496 \times \Delta A$   
V 反总：反应体系总体积， $2.35 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：细胞色素 C 摩尔消光系数， $1.91 \times 10^4$  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。