

线粒体复合体III试剂盒说明书

分光光度法 25 管/24 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、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

试剂一: 25mL×1 瓶, -20℃保存;

试剂二: 5mL×1 瓶, -20℃保存;

试剂三: 0.5 mL×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 万细菌或细胞, 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: 临用前把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 1mL 玻璃比色皿中加入 40 μL 样本、100 μL 试剂六和 800 μL 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:

(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)=[$\Delta A \times V$ 反应 ÷ ($\epsilon \times d$) $\times 10^9$] ÷ (Cpr × V 样) ÷ T = 615 × ΔA ÷ 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)=[$\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 124 \times \Delta A \div W$

(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。

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

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， 9.4×10^{-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； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.04 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，0.202 mL；

T ：反应时间，2 min； C_{pr} ：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。