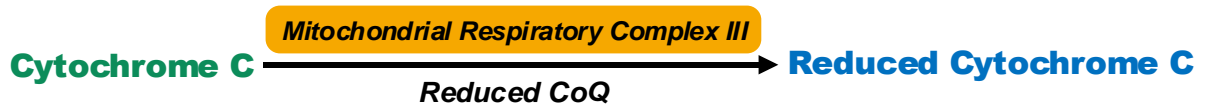




线粒体呼吸链复合体 III 活性检测试剂盒

Mitochondrial Respiratory Complex III Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



线粒体呼吸链复合体 III 活性检测试剂盒

Mitochondrial Respiratory Complex III Activity Assay Kit

一、产品描述

线粒体复合体 III 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，作为线粒体呼吸电子传递链主路和支路的共有成分，负责将还原型 CoQ 的氢传递给细胞色素 C，生成还原型细胞色素 C，其活性的测定对呼吸电子传递链（ETC）状态分析具有重要意义。

线粒体呼吸链复合体 III 能够将还原型 CoQ 的氢传递至细胞色素 C，生成还原型细胞色素 C，产物在 550 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值增加速率即可表征线粒体复合体 III 的活性。

二、产品内容

名称		试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液		液体 80 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	组分 A	粉剂×2 支	-20°C 保存	使用前每瓶组分 B 加入 1 支组分 A 充分溶解 (配制后-20°C 可保存 2 周，避免反复冻融)
	组分 B	液体 10 mL×2 瓶	4°C 保存	
试剂二		液体 1.5 mL×1 支	4°C 保存	-

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿（光径 10 mm）/96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1. 样本处理（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①称取 0.1 g 组织或收集 500 万细胞，加入 1 mL 提取液，使用匀浆器或研钵冰浴研磨至匀浆，匀浆液 4°C 600 g 离心 10 min，留上清；将离心上清液移至另一离心管中，4°C 12000 g 离心 15 min；

②步骤①离心后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）。

③步骤①离心后沉淀中加入 200 μL 提取液，冰浴超声破碎（功率 20%或 200 W，超声 5 s，间隔 10 s，重复 15 次）即为待测样本，用于线粒体复合体 III 活性测定（可用于蛋白含量测定）。

2. 测定步骤

①分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 550 nm，蒸馏水调零。

②在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	对照组 (μL)
试剂一	160	160
试剂二	20	-
37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 孵育 2 min		
待测样本	20	20
蒸馏水	-	20

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 550 nm 处初始吸光值，记为 A1 测定和 A1 对照；②测定 120 s 时 550 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 对照；③计算 ΔA 测定 = A2 测定 - A1 测定， ΔA 对照 = A2 对照 - A1 对照， $\Delta A = \Delta A$ 测定 - ΔA 对照。注：每个样本均需设一个对照组。

3. 线粒体呼吸链复合体 III 活性计算

3.1 使用 96 孔板测定的计算公式

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化生成 1 nmol 还原型细胞色素 C 定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体 III (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{523.56 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

注释： V 样：反应体系中加入待测样本的体积，0.02 mL；V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：细胞色素 C 摩尔消光系数， 1.91×10^4 L/mol/cm； d_1 ：96 孔板光径，0.5 cm；T：反应时间，2 min；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL； 10^9 ：单位换算系数， $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

3.2 使用微量玻璃比色皿测定的计算公式

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化生成 1 nmol 还原型细胞色素 C 定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体 III (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{261.78 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

注释： V 样：反应体系中加入待测样本的体积，0.02 mL；V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：细胞色素 C 摩尔消光系数， 1.91×10^4 L/mol/cm； d_2 ：微量玻璃比色皿光径，1 cm；T：反应时间，2 min；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL； 10^9 ：单位换算系数， $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

四、注意事项

- ①若测定吸光值大于 1.0, 建议将待测样本使用提取液适当稀释后再进行测定, 计算时相应修改;
- ②提取液中含有约 1 mg/mL 的蛋白, 测定样本蛋白浓度时需减去提取液自身的蛋白含量;
- ③准确在相应时间点完成吸光值的测定, 若使用 96 孔板需使用多道移液器且分批进行检测, 以确保组间反应时间一致;
- ④为保证结果准确且避免试剂损失, 测定前请仔细阅读说明书 (以实际收到说明书内容为准), 确认试剂储存和准备是否充分, 操作步骤是否清楚, 且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定, 过程中问题请您及时与工作人员联系;
- ⑤推荐使用样本蛋白浓度计算酶活, 若使用样本质量计算, 则需加测胞浆提取物酶活, 上清和沉淀酶活之和即为总酶活。

附: 使用样本质量计算的公式

3.1 使用 96 孔板测定的计算公式

单位定义: 每 g 组织每分钟催化生成 1 nmol 还原型细胞色素 C 定义为一个酶活力单位。

$$\text{上清中复合体 III (U/g)} = \frac{\Delta A1 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{523.56 \times \Delta A1}{W}$$

$$\text{沉淀中复合体 III (U/g)} = \frac{\Delta A2 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{104.71 \times \Delta A2}{W}$$

$$\text{复合体 III (U/g)} = \text{上清中复合体 III} + \text{沉淀中复合体 III} = \frac{523.56 \times \Delta A1}{W} + \frac{104.71 \times \Delta A2}{W}$$

3.2 使用微量玻璃比色皿测定的计算公式

单位定义: 每 g 组织每分钟催化生成 1 nmol 还原型细胞色素 C 定义为一个酶活力单位。

$$\text{上清中复合体 III (U/g)} = \frac{\Delta A1 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{261.78 \times \Delta A1}{W}$$

$$\text{沉淀中复合体 III (U/g)} = \frac{\Delta A2 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{52.36 \times \Delta A2}{W}$$

$$\text{复合体 III (U/g)} = \text{上清中复合体 III} + \text{沉淀中复合体 III} = \frac{261.78 \times \Delta A1}{W} + \frac{52.36 \times \Delta A2}{W}$$

注释: V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; V 样: 加入待测样本的体积, 0.02 mL; V 提: 待测样本总体积, 1 mL; V 样总: 沉淀重悬体积, 0.2 mL; ϵ : 细胞色素 C 摩尔消光系数, 1.91×10^4 L/mol/cm; d_1 : 96 孔板光径, 0.5 cm; d_2 : 微量玻璃比色皿光径, 1 cm; T: 反应时间, 2 min; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; 10^9 : 单位换算系数, $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$; $\Delta A1$: 上清测定值; $\Delta A2$: 沉淀测定值。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

