

线粒体复合体Ⅲ试剂盒说明书

分光光度法 25 管/24 样

注 意：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 μ L 样本、100 μ L 试剂六和 800 μ 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：

(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。

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

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。

$$\text{复合体 III 活力 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 124 \times \Delta A \div W$$

(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。

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

$V_{\text{反总}}$ ：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； 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。