

## 线粒体呼吸链复合体 III 活性检测试剂盒

### Mitochondrial Respiratory Chain Complex III Activity Assay Kit

可见分光光度法

货号：AK200

规格：25T/12S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
AK200-提取液	20mL×1 瓶	4℃保存；
AK200-A	24mL×1 瓶	4℃保存；
AK200-B	粉剂×1 支	-20℃保存；
AK200-C	1.5mL×1 瓶	4℃保存；易挥发，用完及时密封；
<b>工作液的配制：</b> 临用前把 AK200-B 转移到 AK200-A 中混合溶解，用不完的试剂 -20℃分装保存两周，避免反复冻融。		

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

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。

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。

自备用品：

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/匀浆器、冰和蒸馏水。

样品处理：

1. 准确称取 0.1g 组织或收集 500 万细胞，加入 1mL AK200-提取液，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
2. 将匀浆 600g，4℃离心 10min。
3. 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃离心 15min。
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 200μL AK200-提取液，超声波破碎（功率 20%或 200W，超声 5S，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。

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) 工作液于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）孵育 5min；
  - (2) 在 1mL 玻璃比色皿中加入 800μL 工作液和 100μL AK200-C，然后 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）准确孵育 2min，之后再加入 100μL 样本，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 活性单位的计算：

(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 活性 (U/mg prot) =  $[\Delta A \times V \text{ 反应} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T = 262 \times \Delta A \div Cpr$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit (C05-02001)

V 反总：反应体系总体积，0.001L； $\epsilon$ ：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 样：加入样本体积，0.1mL；T：反应时间，2min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； $10^9$ ：单位换算系数， $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

(2) 按样本鲜重计算（检测样本数为 25T/6S）：

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活性 1(U/g 质量) =  $[\Delta A1 \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V \text{ 提取 1} \times V \text{ 样}) \div T = 262 \times \Delta A1 \div W$

复合体III活性 2(U/g 质量) =  $[\Delta A2 \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V \text{ 提取 2} \times V \text{ 样}) \div T = 52 \times \Delta A2 \div W$

复合体III总活性 (U/g 质量) =  $262 \times \Delta A1 \div W + 52 \times \Delta A2 \div W$

注： $\Delta A1$ ：上清测定值； $\Delta A2$ ：沉淀测定值；V 反总：反应体系总体积，0.001L； $\epsilon$ ：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 样：加入样本体积，0.1mL；V 提取 1：加入提取液体积，1.0 mL；V 提取 2：沉淀重悬体积，0.2 mL；T：反应时间，2 min；W：样本质量，g； $10^9$ ：单位换算系数， $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

#### 注意事项：

1. 为保证实验结果的准确性，需先取 1-2 个样做预实验，如果测定的吸光值  $> 1$ ，建议将样本用提取液稀释后测定，计算结果时注意乘以稀释倍数；
2. 样本蛋白浓度需自行测定，在测定样本和提取液蛋白浓度均需要适当的稀释，由于提取液中含有一定的蛋白（约 1mg/mL），所以在计算样本蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白，但更建议对样本中的线粒体进行单独裂解并测定蛋白浓度。
3. 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。