



线粒体呼吸链复合体III活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: BC3240

规格: 25T/12S、50T/24S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称/规格	25T	50T	保存条件
提取液	液体 20 mL×1 瓶	液体 40 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	液体 20 mL×2 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C保存
试剂三	液体 3 mL×1 支	液体 5.5 mL×1 瓶	4°C保存

溶液的配制:

- 1、工作液的配制: 临用前把试剂二转移到试剂一中混合溶解, 用不完的试剂 4°C可保存一周;

产品说明:

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。

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。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

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/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

- 1、称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞, 加入 1.0 mL 提取液, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 2、4 °C 600 g 离心 10min。将上清液移至另一离心管中, 4 °C 11000 g 离心 15min。
- 3、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, 可以判断线粒体提取效果)。
- 4、在沉淀中加入 200μL 提取液, 超声波破碎 (功率 20%, 超声 5 秒, 间隔 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。

二、测定步骤

- 1、可见分光光度计预热30min以上, 调节波长至550nm, 蒸馏水调零。
- 2、操作表: 在1mL玻璃比色皿中分别加入

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
工作液	800	800
试剂三	100	-

37°C（哺乳动物）或25°C（其它物种）准确孵育2min，之后分别加入		
样本	100	100
蒸馏水	-	100
立即混匀，记录550nm处初始吸光值A1和 2min 的吸光值A2，分别记为A1测定、A2测定，A1对照、A2对照。计算 $\Delta A = (A2_{\text{测定}} - A1_{\text{测定}}) - (A2_{\text{对照}} - A1_{\text{对照}})$ 。		

三、复合体III活力单位的计算

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(U/mg prot)=[$\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 261 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

V反总：反应体系总体积，0.001L； ϵ ：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， $1 \text{mol} = 10^9 \text{nmol}$ 。

注意事项：

- 1、尽量保持比色皿内反应液温度在 37°C 或 25°C。可以在记录初始吸光度 A1 后迅速将比色皿连同反应液一起放入 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）水浴中准确反应 2 分钟，之后迅速取出比色皿并擦干，记录 2min 时的吸光度。
- 2、当测定吸光值大于 1 时，建议将样本用提取液稀释后测定，计算公式中注意乘以稀释倍数。
- 3、此法需要自行测定样本蛋白质浓度。
- 4、由于提取液中含有一定浓度的蛋白（约 1mg/mL），所以在测定样本蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白含量(单独测定)。
- 5、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。
- 6、本试剂盒试剂足够完成 50 管反应。
- 7、附:使用样本重量计算公式：（样本检测数为 50T/12S）

A、上清中复合体III活力的计算：

按样本质量计算：

单位的定义：每g组织每分钟催化产生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(U/g 质量)=[$\Delta A1 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 262 \times \Delta A1 \div W$

$\Delta A1$ ：上清测定值；V反总：反应体系总体积，0.001L； ϵ ：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：加入提取液体积，1.0mL；W：样本质量，g；T：反应时间，2min； 10^9 ：单位换算系数， $1 \text{mol} = 10^9 \text{nmol}$ 。

B、沉淀中复合体III活力的计算：

按样本质量计算：

单位的定义：每g组织每分钟催化产生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(U/g 质量)=[$\Delta A2 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 52 \times \Delta A2 \div W$

$\Delta A2$ ：沉淀测定值；V反总：反应体系总体积，0.001L； ϵ ：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：加入提取液体积，0.2mL；W：样本质量，g；T：反应时间，2min； 10^9 ：单位换算系数， $1 \text{mol} = 10^9 \text{nmol}$ 。

C、样本复合体III总活力的计算：

样本复合体III总活力即为上清中复合体III活力与沉淀中复合体III活力之和。

按样本质量计算：复合体III（U/g 质量）= $262 \times \Delta A1 \div W + 52 \times \Delta A2 \div W$

实验实例：

1. 取 0.1g 兔子肾脏进行样本处理，将复溶后的沉淀稀释 4 倍后按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A = (A2 \text{ 测定} - A1 \text{ 测定}) - (A2 \text{ 对照} - A1 \text{ 对照}) = (0.548 - 0.481) - (0.478 - 0.461) = 0.05$ ，按样本蛋白浓度计算得：

复合体III（U/mg prot）= $262 \times \Delta A \div Cpr \times 4$ （稀释倍数）= $262 \times 0.05 \div 2.56 \times 4$ （稀释倍数）=20.47 U/mg prot。

相关发表文献：

[1] Ming Song, Fangfang Chen, Yihui Li, et al. Trimetazidine restores the positive adaptation to exercise training by mitigating statin-induced skeletal muscle injury. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. November 2017; (IF10.754)

[2] Liuqin He, Haiwen Zhang, Xihong Zhou. Weanling Offspring of Dams Maintained on Serine-Deficient Diet Are Vulnerable to Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. September 2018; (IF4.868)

[3] Qiuli OuYang, Nengguo Tao, Miaoling Zhang. A Damaged Oxidative Phosphorylation Mechanism Is Involved in the Antifungal Activity of Citral against *Penicillium digitatum*. *Frontier in Immunology*. February 2018; (IF4.259)

[4] Wang M, Zhang Y, Xu M, et al. Roles of TRPA1 and TRPV1 in cigarette smoke-induced airway epithelial cell injury model[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2019, 134: 229-238.

[5] Bao Z, Xu X, Chao H, et al. ERK/Nrf2/HO-1 pathway-mediated mitophagy alleviates traumatic brain injury-induced intestinal mucosa damage and epithelial barrier dysfunction[J]. 2017.

参考文献：

[1] Luo C, Long J, Liu J. An improved spectrophotometric method for a more specific and accurate assay of mitochondrial complex III activity[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2008, 395(1-2): 38-41.

相关系列产品：

BC0510/BC0515 线粒体呼吸链复合体I活性检测试剂盒

BC0940/BC0945 线粒体呼吸链复合体IV活性检测试剂盒

BC1440/BC1445 线粒体呼吸链复合体V活性检测试剂盒

