

## 线粒体呼吸链复合体III检测试剂盒（分光光度法）

**注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。**

### 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。

### 试剂组成和配制：

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 40μL 样本、100μL 试剂六和 800μL 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。

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

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。

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

- (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。

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

V 反总：反应体系总体积， $9.4 \times 10^{-4}$  L；

$\epsilon$ ：细胞色素 C 摩尔消光系数， $1.91 \times 10^4$  L / mol / cm；

d：比色皿光径，1cm；

V 样：加入样本体积，0.04 mL；

V 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。