

线粒体呼吸链复合体III/CoQ-细胞色素 C 还原酶检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1102

保存：-20℃避光保存 6 个月

规格：48T/96T

适用样本：动植物组织和细胞

产品简介

线粒体呼吸链复合体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。本试剂盒提供了一种简单的检测方法，用于检测生物体内线粒体呼吸链复合体III活性，其原理是线粒体呼吸链复合体III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呼吸链 III 酶活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
试剂一	50mL	100mL	4℃ 保存
试剂二	10mL	20mL	4℃ 保存
试剂三	1mL	2mL	4℃ 避光保存
试剂四	10mL	20mL	4℃ 保存
试剂五	1	1	-20℃ 避光保存
试剂六	1.25mL	2.5mL	-20℃ 避光保存

自备耗材

酶标仪或紫外分光光度计（能测 550nm 处的吸光度）及恒温箱

96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头

制冰机、低温离心机

去离子水

匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

试剂二：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

试剂三：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 避光保存。

试剂六：即用型；使用前，平衡到室温；分装后-20℃避光保存，避免反复冻融。

工作液的配制：临用前，将试剂五转移到试剂四中混合溶解，如果检测样本是哺乳动物来源，请置于 37℃ 孵育 5min；如果样本是其他物种，则置于 25℃ 孵育 5min。

样本制备

注意：推荐使用新鲜样本，以保证酶的活力。

产品说明书

线粒体呼吸链复合体III的提取:

1. 准确称取 0.1g 组织或收集 500 万个细胞, 加入 1mL 试剂一和 10 μ L 试剂三, 冰浴匀浆;
2. 离心匀浆液, 600g, 5min, 4 $^{\circ}$ C, 收集上清液至另一新的离心管中, 舍弃沉淀;
3. 再次离心上清, 11,000g, 10min, 4 $^{\circ}$ C, 沉淀即为提取的线粒体, 用作第 5 步操作;
4. (选做) 上清液即为胞浆提取物, 可作为样本用于测定从线粒体泄漏的线粒体呼吸链复合体III, 用于判断线粒体提取效果;
5. 在沉淀中加入 200 μ L 试剂二和 2 μ L 试剂三, 充分重悬沉淀, 用于下一步线粒体呼吸链复合体III酶活性检测。

实验步骤

1. 酶标仪或可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 550nm, 可见分光光度计去离子水调零。
 2. 在 96 孔板或微量玻璃比色皿中加入 25 μ L 试剂六和 200 μ L 工作液, 充分混匀后, 准确反应 2min, 然后加入 10 μ L 样本充分混匀后, 立即读取 550nm 处 0 min 的初始吸光值 A_1 和 2min 后的吸光值 A_2 , 计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。
- 注意:** 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 ΔA 过高 (高于 1.0), 可用试剂二稀释样本后再测定, 计算结果时注意乘以稀释倍数。若 ΔA 偏小, 则可以通过增加加入的样本体积来提高灵敏度。
2. 测定反应的温度对测定结果有影响, 请控制在 25 $^{\circ}$ C (一般物种) 或者 37 $^{\circ}$ C (哺乳动物)。
 3. 因通过反应速率计算酶活, 使用 96 孔板时请根据操作速度控制一次测定的样本数 (通常一次测定 4 个样本)

结果计算

A. 使用 96 孔板测定的计算公式

1. 按样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织在反应体系中每分钟生成 1nmol 还原型细胞色素 C 定义为一个酶活力单位。

上清中复合体III活力的计算:

$$\text{复合体III上清活力 (U/g 鲜重)} = [\Delta A_1 \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1243 \times \Delta A_1 \div W$$

沉淀中复合体III活力的计算:

$$\text{复合体III沉淀活力 (U/g 鲜重)} = [\Delta A_2 \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V_{\text{重悬}} \times V_{\text{样}}) \div T = 249 \times \Delta A_2 \div W$$

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总活力 (U/g 鲜重) = $1243 \times \Delta A_1 \div W + 249 \times \Delta A_2 \div W$

2. 按细胞数量计算

单位的定义: 每 1 万个细胞每分钟生成 1 nmol 还原型细胞色素 C 定义为一个酶活力单位。

上清中复合体III活力的计算:

$$\text{复合体III上清活力 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A_1 \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times 500) \div T = 2.49 \times \Delta A_1$$

沉淀中复合体III活力的计算:

$$\text{复合体III沉淀活力 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A_2 \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{重悬}} \times 500) \div T = 0.497 \times \Delta A_2$$

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。

按细胞数量计算: 复合体III总活力 (U/10⁴ cell) = $2.49 \times \Delta A_1 + 0.497 \times \Delta A_2$

$V_{\text{反应}}$: 反应体系总体积, 2.35×10^{-4} L; ϵ : 还原型细胞色素 C 摩尔消光系数, 19.1×10^3 mol/L/cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm; 10^9 : 单位换算系数, 1mol=10⁹nmol; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.01mL; T: 反应时间, 2min; ΔA_1 : 上清测定值; W: 样本重量, g; $V_{\text{提取}}$: 提取体系体积, 1.01mL; ΔA_2 : 沉淀测定值; $V_{\text{重悬}}$: 重悬沉淀体积, 0.202mL; 500: 细胞总数, 500 万。

B. 使用微量玻璃比色皿进行测定的计算公式

将上述计算公式中光径 d: 0.5cm 调整为 d: 1cm 进行计算即可。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验, 尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究, 如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途, 我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用, 并严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用; 否则, 可能导致结果异常。

产品说明书

5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1100 线粒体呼吸链复合体 I /NADH-辅酶 Q 还原酶检测试剂盒（微量法）

PMK1101 线粒体呼吸链复合体 II /琥珀酸-辅酶 Q 还原酶检测试剂盒（微量法）

PMK1103 线粒体呼吸链复合体 IV /细胞色素 C 氧化酶检测试剂盒（微量法）

PMK1104 线粒体呼吸链复合体 V /ATP 合酶/三磷酸腺苷合酶检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

