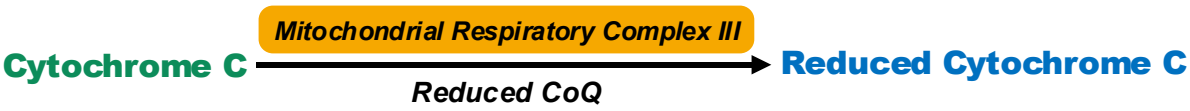
线粒体呼吸链复合体 III 活性检测试剂盒

Mitochondrial Respiratory Complex III Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

Catalog Number **AKOP007M**
Storage Temperature **-20°C**
Size **100T/48S**

线粒体呼吸链复合体 III 活性检测试剂盒

Mitochondrial Respiratory Complex III Activity Assay Kit

一、产品描述

线粒体复合体 III 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，作为线粒体呼吸电子传递链主路和支路的共有成分，负责将还原型 CoQ 的氢传递给细胞色素 C，生成还原型细胞色素 C，其活性的测定对呼吸电子传递链（ETC）状态分析具有重要意义。

线粒体呼吸链复合体 III 能够将还原型 CoQ 的氢传递至细胞色素 C，生成还原型细胞色素 C，产物在 550 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值增加速率即可表征线粒体复合体 III 的活性。

二、产品内容

名称		试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液		液体 80 mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂一	**组分 A**	粉剂×2 支	-20℃保存	**使用前每瓶组分 B 加入 1 支组分 A 充分溶解**（配制后-20℃可保存 2 周，避免反复冻融）
	组分 B	液体 10 mL×2 瓶	4℃保存	
试剂二		液体 1.5 mL×1 支	4℃保存	-

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿（光径 10 mm）/96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.样本处理（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①称取 0.1 g 组织或收集 500 万细胞，加入 **1 mL 提取液**，使用匀浆器或研钵冰浴研磨至匀浆，匀浆液 4℃ 600 g 离心 10 min，**留上清**；将离心上清液移至另一离心管中，4℃ 12000 g 离心 15 min；

②步骤①离心后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）。

③步骤①离心后沉淀中加入 **200 μL 提取液**，冰浴超声破碎（功率 20%或 200 W，超声 5 s，间隔 10 s，重复 15 次）即为**待测样本**，用于线粒体复合体 III 活性测定（可用于蛋白含量测定）。

Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

2.测定步骤

①分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 550 nm，蒸馏水调零。

②在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组（μL）	对照组（μL）
试剂一	160	160
试剂二	20	-
37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）孵育 2 min		
待测样本	20	20
蒸馏水	-	20

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 550 nm 处初始吸光值，记为 A1 测定和 A1 对照；②测定 120 s 时 550 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 对照；③计算ΔA 测定=A2 测定-A1 测定，ΔA 对照=A2 对照-A1 对照，ΔA=ΔA 测定-ΔA 对照。注：每个样本均需设一个对照组。

3.线粒体呼吸链复合体 III 活性计算

3.1 使用 96 孔板测定的计算公式

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化生成 1 nmol 还原型细胞色素 C 定义为一个酶活力单位。

$$复合体\ III（U/mg\ prot）= \frac{\Delta A \times V_{反总} \times 10^9}{\varepsilon \times d_1 \times V_{样} \times Cpr \times T} = \frac{523.56 \times \Delta A}{Cpr}$$

注释：V 样：反应体系中加入待测样本的体积，0.02 mL；V 反总：反应体系总体积，2×10^{-4} L；ε：细胞色素 C 摩尔消光系数，1.91×10^4 L/mol/cm；d_1：96 孔板光径，0.5 cm；T：反应时间，2 min；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；10^9：单位换算系数，1 mol=10^9 nmol。

3.2 使用微量玻璃比色皿测定的计算公式

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化生成 1 nmol 还原型细胞色素 C 定义为一个酶活力单位。

$$复合体\ III（U/mg\ prot）= \frac{\Delta A \times V_{反总} \times 10^9}{\varepsilon \times d_2 \times V_{样} \times Cpr \times T} = \frac{261.78 \times \Delta A}{Cpr}$$

注释：V 样：反应体系中加入待测样本的体积，0.02 mL；V 反总：反应体系总体积，2×10^{-4} L；ε：细胞色素 C 摩尔消光系数，1.91×10^4 L/mol/cm；d_2：微量玻璃比色皿光径，1 cm；T：反应时间，2 min；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；10^9：单位换算系数，1 mol=10^9 nmol。

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

四、注意事项

①若测定吸光值大于 1.0，建议将待测样本使用提取液适当稀释后再进行测定，计算时相应修改；

②提取液中含有约 1 mg/mL 的蛋白，测定样本蛋白浓度时需减去提取液自身的蛋白含量；

③准确在相应时间点完成吸光值的测定，若使用 96 孔板需使用多道移液器且分批进行检测，以确保组间反应时间一致；

④为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系；

⑤推荐使用样本蛋白浓度计算酶活，若使用样本质量计算，则需加测胞浆提取物酶活，上清和沉淀酶活之和即为总酶活。

附：使用样本质量计算的公式

3.1 使用 96 孔板测定的计算公式

单位定义：每 g 组织每分钟催化生成 1 nmol 还原型细胞色素 C 定义为一个酶活力单位。

$$\text{上清中复合体 III（U/g）} = \frac{\Delta A1 \times V_{反总} \times V_{提} \times 10^9}{\varepsilon \times d_1 \times W \times V_{样} \times T} = \frac{523.56 \times \Delta A1}{W}$$

$$\text{沉淀中复合体 III（U/g）} = \frac{\Delta A2 \times V_{反总} \times V_{样总} \times 10^9}{\varepsilon \times d_1 \times W \times V_{样} \times T} = \frac{104.71 \times \Delta A2}{W}$$

$$\text{复合体 III（U/g）=上清中复合体 III+沉淀中复合体 III=} \frac{523.56 \times \Delta A1}{W} + \frac{104.71 \times \Delta A2}{W}$$

3.2 使用微量玻璃比色皿测定的计算公式

单位定义：每 g 组织每分钟催化生成 1 nmol 还原型细胞色素 C 定义为一个酶活力单位。

$$\text{上清中复合体 III（U/g）} = \frac{\Delta A1 \times V_{反总} \times V_{提} \times 10^9}{\varepsilon \times d_2 \times W \times V_{样} \times T} = \frac{261.78 \times \Delta A1}{W}$$

$$\text{沉淀中复合体 III（U/g）} = \frac{\Delta A2 \times V_{反总} \times V_{样总} \times 10^9}{\varepsilon \times d_2 \times W \times V_{样} \times T} = \frac{52.36 \times \Delta A2}{W}$$

$$\text{复合体 III（U/g）=上清中复合体 III+沉淀中复合体 III=} \frac{261.78 \times \Delta A1}{W} + \frac{52.36 \times \Delta A2}{W}$$

注释： $V_{反总}$：反应体系总体积，2×10^{-4} L；$V_{样}$：加入待测样本的体积，0.02 mL；$V_{提}$：待测样本总体积，1 mL；$V_{样总}$：沉淀重悬体积，0.2 mL；ε：细胞色素 C 摩尔消光系数，1.91×10^4 L/mol/cm；d_1：96 孔板光径，0.5 cm；d_2：微量玻璃比色皿光径，1 cm；T：反应时间，2 min；W：样本质量，g；10^9：单位换算系数，1 mol=10^9 nmol；ΔA1：上清测定值；ΔA2：沉淀测定值。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.