

线粒体呼吸链复合体III/CoQ-细胞色素 C 还原酶活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

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	25T 规格	50T 规格	保存条件
提取液	液体 20 mL×1 瓶	液体 40 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 24mL×1 瓶	液体 24mL×2 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂三	液体 1.5 mL×1 支	液体 3mL×1 瓶	2-8℃保存

25T 溶液的配制：

- 1、工作液的配制：临用前将试剂二转移到试剂一中混合溶解，用不完的试剂-20℃分装保存 2 周，避免反复冻融。
- 2、试剂三易挥发，用完及时密封。

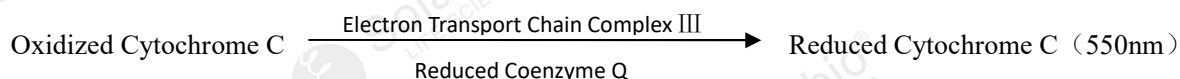
50T 溶液的配制：

- 1、工作液配制：临用前把 1 支试剂二转移到 1 瓶试剂一中混合溶解（约 30T），用不完的试剂-20℃分装保存 2 周，避免反复冻融。
- 2、试剂三易挥发，用完及时密封。

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。

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/细胞超声破碎仪、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℃ 600 g 离心 10min。将上清液移至另一离心管中，4℃ 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 200W，超声 5 秒，间隔 10 秒，重复 15 次），用于复合体III 酶活性测定。（若使用蛋白浓度计算酶活，此步骤加入的提取液可提高至 220-250μL，其中 200μL 用于操作表加样，剩余用于蛋白含量测定）

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℃（哺乳动物）或25℃（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10s吸光值A1和 2min 后吸光值A2，分别记为A1测定、A2测定，A1 对照、A2对照。计算 $\Delta A = (A2_{\text{测定}} - A1_{\text{测定}}) - (A2_{\text{对照}} - A1_{\text{对照}})$ 。每个测定管需设置一个对照管。		

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)=[$\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$]÷(Cpr×V样)÷T=262× $\Delta A \div Cpr$

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℃或 25℃。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℃（哺乳动物）或 25℃（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 25 管反应。
- 7、附:使用样本重量计算公式：（样本检测数为 25T/6S）

A、上清中复合体III活力的计算：

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。

复合体III活力(U/g 质量)=[$\Delta A1 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$]÷(W÷V提取×V样)÷T=262× $\Delta A1 \div W$



ΔA_1 : 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:

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)=[$\Delta A_2 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 52 \times \Delta A_2 \div W$

ΔA_2 : 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。

复合体III (U/g 质量) = $262 \times \Delta A_1 \div W + 52 \times \Delta A_2 \div W$

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 $\Delta A = (A_2 \text{ 测定} - A_1 \text{ 测定}) - (A_2 \text{ 对照} - A_1 \text{ 对照}) = (0.548 - 0.481) - (0.478 - 0.461) = 0.05$, 按样本蛋白浓度计算得:

复合体III (U/mg prot) = $262 \times \Delta A \div \text{Cpr} \times 4$ (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] Li C, Wu B, Li Y, Chen J, Ye Z, Tian X, Wang J, Xu X, Pan S, Zheng Y, Cai X, Jiang L, Zhao M. Amino acid catabolism regulates hematopoietic stem cell proteostasis via a GCN2-eIF2 伪 axis. Cell Stem Cell. 2022 Jul 7;29(7):1119-1134.e7. doi: 10.1016/j.stem.2022.06.004. PMID: 35803229.

[2] Wang K, Wang M, Liao X, Gao S, Hua J, Wu X, Guo Q, Xu W, Sun J, He Y, Li Q, Gao W. Locally organised and activated Fth1hi neutrophils aggravate inflammation of acute lung injury in an IL-10-dependent manner. Nat Commun. 2022 Dec 13;13(1):7703. doi: 10.1038/s41467-022-35492-y. PMID: 36513690; PMCID: PMC9745290.

[3] Feng X, Zhang J, Wu L, Lin W, Liu Z, Zhou X, Qi Y, Chen Z, Zeng L, Zheng C, Hu X, Zhang Q, Song H. Drug Self-Delivery Nanocubes Enhance O2-Economized Photodynamic-Immunotherapy of Triple-Negative Breast Cancer by Downregulating Wnt/ β -catenin Signaling. Adv Healthc Mater. 2023 Jul;12(19):e2203019. doi: 10.1002/adhm.202203019. Epub 2023 May 14. PMID: 37104840.

[4] Yang S, He X, Zhao J, Wang D, Guo S, Gao T, Wang G, Jin C, Yan Z, Wang N, Wang Y, Zhao Y, Xing J, Huang Q. Mitochondrial transcription factor A plays opposite roles in the initiation and progression of colitis-associated cancer. Cancer Commun (Lond). 2021 Aug;41(8):695-714. doi: 10.1002/cac2.12184. Epub 2021 Jun 23. PMID: 34160895; PMCID: PMC8360642.

[5] Zhu SY, Zhou WQ, Niu YY, Zheng C, Liu X, Zhang YY, Yu C. COX17 restricts renal fibrosis development by maintaining mitochondrial copper homeostasis and restoring complex IV activity. Acta Pharmacol Sin. 2023 Oct;44(10):2091-2102. doi: 10.1038/s41401-023-01098-3. Epub 2023 May 22. PMID: 37217601; PMCID: PMC10545728.

参考文献:





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

