



线粒体呼吸链复合物 III 活性比色法定量检测试剂盒产品说明书

(A089-3-1 20 管/10 样)

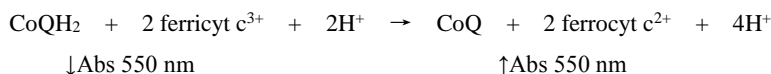
一、主要用途

线粒体呼吸链复合物 III（辅酶 Q-细胞色素 C 还原酶）活性比色法定量检测试剂是一种旨在使用还原性合成辅酶 Q 同功类似物和特异性抑制剂，通过反应系统测定样品中细胞色素 C 还原后峰值的增高，即采用比色法测定样品中酶活性的权威而经典的技术方法。该技术经过精心研制、成功实验证明的。其适合于各种纯化线粒体样品（动物、人体、酵母）以及细胞或组织裂解悬液样品的辅酶 Q-细胞色素 C 还原酶的特异性活性检测。可用于衰老、能量代谢、蛋白组学、病理生理学、神经病变等研究。产品不含污染性蛋白酶，严格无菌，即到即用，操作简捷，性能稳定，反应优化，检测敏感。

二、技术背景

线粒体呼吸链复合物 III，通常称为辅酶 Q—细胞色素 C 还原酶、细胞色素还原酶或 bc1 复合物（ubiquinol cytochrome c oxidoreductase; cytochrome reductase; bc1 complex），是线粒体电子传递链的中心元素：含有十一个亚单位，包括细胞色素 b（Cytochrome b），细胞色素 c1（cytochrome c1）和 Rieske 铁硫蛋白（Rieske iron-sulfur protein），通过 Q 循环（Q cycle）进行催化作用。其特征性的酶活性是抗霉素敏感的辅酶 Q—细胞色素 C 还原酶。复合物 III 催化氧化型细胞色素 C 被还原为还原型细胞色素 C，线粒体内电子由供体还原型泛醌（ubiquinol; UQH₂）或还原型辅酶 Q（reduced Coenzyme Q; CoQH₂）传递到细胞色素 C 上的能量转移反应，进行呼吸链传递。该酶异常会导致心肌疾病。辅酶 Q—细胞色素 C 还原酶反应系统测定氧化型细胞色素 C 的浓度变化。基于还原型泛醌或还原型辅酶 Q 底物，在抗霉素存在与否的情况下，通过辅酶 Q-细胞色素 C 还原酶的催化，转化成泛醌（ubiquinone; UQ）或辅酶 Q（Coenzyme Q; CoQ），同时氧化型细胞色素 C，转化为还原型细胞色素 C，在分光光度仪下产生吸光峰值的变化（550nm 波长），由此定量测定辅酶 Q—细胞色素 C 还原酶的特异活性。其反应系统是：

Complex III



三、产品内容

缓冲液（Reagent A）	20 毫升
反应液（Reagent B）	125 微升
阴性液（Reagent C）	2 毫升
底物液（Reagent D）	500 微升
专性液（Reagent E）	200 微升
稳定液 A（Reagent F1）	4 管
稳定液 B（Reagent F2）	5 毫升
产品说明书	1 份



四、保存方式

保存在-20℃冰箱里，避免反复冻融；反应液（Reagent B）和底物液（Reagent D），避免光照，有效保证 3 月

五、用户自备

比色皿：用于比色分析的容器

分光光度仪：用于比色分析

培养箱：用于孵育反应物

六、实验步骤

实验开始前，将-20℃冰箱里的试剂盒中的试剂溶液置入冰槽里融化；反应液（Reagent B）和底物液（Reagent D）注意避光。

（一）、测定准备

- 1、准备好待测样品（例如纯化线粒体样品等），置于冰槽里
- 2、设定好分光光度仪（温度为 30℃）：波长为 550nm，间隔 60 秒，读数 3 次（共 2 分钟），并置零
- 3、缓冲液（Reagent A）室温下均衡温度
- 4、实验开始前，将-20℃冰箱里的试剂盒中的稳定液 B（Reagent F2）置入冰槽里融化，然后移出 1 毫升到稳定液 A（Reagent F1）管里，混匀后，标记为稳定工作液，置于冰槽里备用（注意，15 分钟内使用，用完后丢弃）。然后将-20℃冰箱里的试剂盒中的反应液（Reagent B）室温下融化，然后移出 10 微升到新的 1.5 毫升离心管，加入 10 微升稳定工作液，轻柔混匀后，室温下避光静置 15 分钟（可见颜色变白），标记为反应工作液。然后即刻进行下列操作。

（二）、背景对照测定

- 1、移取 870 微升缓冲液（Reagent A）到新的比色皿
- 2、加入 10 微升反应工作液
- 3、加入 20 微升底物液（Reagent D）
- 4、室温下静置 10 分钟，避免光照
- 5、加入 100 微升阴性液（Reagent C）
- 6、上下倾倒数次，混匀（限定在 3 秒之内）
- 7、即刻放入分光光度仪检测，此为背景空对照：
550 波长读数 1 分钟或 2 分钟—550 波长读数 0 分钟

（三）、样品总活性测定

- 1、移取 870 微升 GENMED 缓冲液（Reagent A）到新的比色皿
- 2、加入 10 微升 GENMED 反应工作液
- 3、加入 20 微升 GENMED 底物液（Reagent D）
- 4、室温下静置 10 分钟，避免光照



- 5、加入 100 微升待测样品（注意：15 微克总线粒体蛋白）
- 6、上下倾倒数次，混匀（限定在 3 秒之内）
- 7、即刻放入分光光度仪检测，此为样品总活性读数：
550 波长读数 1 分钟或 2 分钟—550 波长读数 0 分钟

（四）、样品非特异活性测定

- 1、移取 850 微升 GENMED 缓冲液（Reagent A）到新的比色皿
- 2、加入 10 微升 GENMED 反应工作液，避免光照
- 3、加入 20 微升 GENMED 底物液（Reagent D）
- 4、室温下静置 10 分钟，避免光照
- 5、加入 20 微升 GENMED 专性液（Reagent E）
- 6、加入 100 微升待测样品（注意：15 微克总线粒体蛋白）
- 7、上下倾倒数次，混匀（限定在 3 秒之内）
- 8、即刻放入分光光度仪检测，此为样品非特异活性读数：
550 波长读数 1 分钟或 2 分钟—550 波长读数 0 分钟

（五）、计算样品活性

（1）、样品活性（总活性或非特异活性）

$$\frac{(\text{样本读数} - \text{背景读数}) \times \text{体系容量} (1\text{ml}) \times \text{样本稀释倍数}}{\text{样本容量} (0.1\text{ml}) \times 21.84 (\text{毫摩尔吸光系数}) \times \text{反应时间} (1 \text{ 或者 } 2 \text{ 分钟})} \div \frac{\text{样本蛋白浓度}}{(\text{mgprot/ml})}$$

单位：μ mol CoQH₂/min/mgprot

（2）、样品特异活性

样品总活性—样品非特异活性=样品特异活性

七、注意事项

- 1、本产品为 21 次操作（10 个样本），包括 1 次背景对照测定
- 2、操作时，须戴手套
- 3、系统操作过程中，背景测定只需 1 次
- 4、线粒体样品检测前，须溶解；建议冻存融解（-70℃至 37℃）循环 3 次
- 5、如果增强酶活检测，建议使用线粒体复合物待测样品预处理试剂盒
- 6、每增加 1 个样品，增加反应工作液为反应液（Reagent B）5 微升+稳定工作液 5 微升，以此类推。配制反应工作液时，须根据样本数量配制实际工作液容量
- 7、用户可以根据实际样品，计算缓冲液（Reagent A）、反应工作液和底物液（Reagent D）三者之和，混匀后，室温下静置 10 分钟，置于冰槽里等待检测
- 8、加入样品启动反应后 3 秒内即刻比色测定
- 9、分光光度计波长严格设置在 550nm，误差 10nm 将不产生信号
- 10、测定可以持续 2 分钟



- 11、测定值由低到高变化，即 2 分钟测定读数高于 0 分钟测定读数，表明有酶活性
- 12、比色测定后，比色皿须清洗彻底
- 13、建议用户使用分光光度仪检测，总体系减半可以增加检测样本数
- 14、建议待测样本线粒体蛋白浓度为 15 微克/100 微升；如果样本酶活性过低或过高，则可以增加或降低样本量；注意计算公式的调整（本公司 Bradford 蛋白质浓度定量试剂盒）
- 15、如果使用细胞或组织裂解悬液，则蛋白浓度为 50 微克/100 微升
- 16、样品特异活性是指抗霉素敏感的辅酶 Q—细胞色素 C 还原酶，去除其它干扰因素（例如复合物 I/II/IV 等）
- 17、线粒体呼吸链复合物 III（辅酶 Q—细胞色素 C 还原酶）单位活性定义为：在 30℃，pH 7.5 条件下，每分钟内能够氧化 1 微摩尔还原型泛醌（CoQH₂）所需的酶量作为一个活性单位
- 18、本公司提供系列线粒体及其酶类技术产品

八、质量标准

本产品经鉴定性能稳定

本产品经鉴定检测准确