

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: GBQ123

产品规格: 48T(23 samples)/96T(47 samples)

检测仪器: 酶标仪(540-560 nm)

Elabscience®线粒体呼吸链复合物III(辅酶 Q-细胞色素 C 还原酶)比色法测试盒

Mitochondrial Complex III (Coenzyme Q-Cytochrome C Reductase) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测组织样本中的线粒体呼吸链复合物III(辅酶 Q-细胞色素 c 还原酶)的酶活。

检测原理

线粒体作为细胞器，是细胞内的“动力工厂”，是细胞有氧呼吸的主要场所，它的功能是通过氧化磷酸化进行能量转换，为细胞活动提供能量。其中，氧化过程由线粒体内膜上的 4 个呼吸链膜蛋白复合物(简称复合物 I、II、III 和 IV)来完成。线粒体呼吸链复合物 III 又称为细胞色素 c 还原酶复合体，主要功能是将线粒体呼吸链复合物 I、II 形成的还原型辅酶 Q₁₀，氧化成氧化性辅酶 Q₁₀。线粒体呼吸链复合物 III 将氧化型细胞色素 c 转化成还原型细胞色素 c，造成 550 nm 吸光度上升，通过检测 550 nm 波长下吸光度上升的速率来计算酶活。

本试剂盒检测组织样本时，需测定蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 GBQ162)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 A (Extraction Solution A)	55 mL×1 瓶	55 mL×2 瓶	-20°C 保存 3 个月
试剂二 (Reagent 2)	提取液 B (Extraction Solution B)	13 mL×1 瓶	26 mL×1 瓶	-20°C 保存 3 个月
试剂三 (Reagent 3)	提取液 C (Extraction Solution C)	1.2 mL×1 支	1.2 mL×2 支	-20°C 避光 保存 3 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 A (Substrate A)	3 mL×1 瓶	6 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 3 个月
试剂五 (Reagent 5)	稀释液 (Diluent)	7 mL×1 瓶	14 mL×1 瓶	-20°C 保存 3 个月
试剂六 (Reagent 6)	底物 B (Substrate B)	0.8 mL×1 支	1.6 mL×1 支	-20°C 避光 保存 3 个月
试剂七 (Reagent 7)	稳定剂 (Stabilizer)	粉剂×3 支	粉剂×6 支	-20°C 避光 保存 3 个月
试剂八 (Reagent 8)	缓冲液 (Buffer Solution)	13 mL×1 瓶	26 mL×1 瓶	-20°C 保存 3 个月
试剂九 (Reagent 9)	抑制剂对照液 (Inhibitor Controlled Solution)	1.5 mL×1 支	3 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 3 个月
试剂十 (Reagent 10)	抑制剂 (Inhibitor)	1.5 mL×1 支	3 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 3 个月
	96 孔酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(540-560 nm，最佳检测波长 550 nm)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中试剂平衡至室温待用。

② 试剂六使用前准备：

试剂六在使用前于37°C放置10 min，溶液混匀至澄清待用，分装后-20°C保存1个月。

③ 试剂七工作液配制：

使用前取一支试剂七加入2 mL试剂五溶解，混匀，置于冰上避光，6 h内使用有效。

④ 反应工作液的配制

根据用量，按照试剂七工作液：试剂六=1:2的体积比混合，室温避光静置3 min后立即使用，配好的反应工作液为乳白色悬浊液，在30 min使用有效。

样本准备

① 样本处理

组织样本：组织用PBS（0.01 M，pH 7.4）清洗3次后使用滤纸吸干，按照组织重量（g）：试剂一体积（mL）=1: 9的比例匀浆，4℃，600 × g离心5 min，上清转移到预冷的离心管中，11000 × g以上离心10 min，弃上清取沉淀，加入200 μL试剂二和10 μL试剂三，超声1 min，11000 × g离心10 min，取上清待用，留取部分上清用于线粒体蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：4.45-106.8 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%大鼠肝组织	1-2	10%大鼠肾组织	1-2
10%大鼠脑组织	不稀释	10%大鼠肺组织	不稀释
10%大鼠脾组织	不稀释	10%小鼠肝组织	1-2
10%小鼠肾组织	1-2	10%小鼠脑组织	不稀释
10%小鼠肺组织	不稀释	10%小鼠脾组织	不稀释

注：稀释液为试剂二。

实验关键点

- ① 线粒体样本处理后尽量在 4 h 内测定，若放置时间久，特异性酶活降低，样本测定结果偏小。
- ② 加入试剂四后在 10 s 左右开始测定，每次测定样本数不超过 4 个。
- ③ 空白孔的平均变化 OD 值△A 应在± 0.005 以内，说明试剂可用，如果超过该范围，需检查试剂六是否澄清，延长孵育时间。

操作步骤

- ① 总酶活样本：将样本与试剂九按照体积= 20 μ L : 20 μ L 混合，混匀 10 s，室温避光静置 5 min 后待用。
非特异性酶活样本：将样本与试剂十按照体积=20 μ L : 20 μ L 混合，混匀 10 s，室温避光静置 5 min 后待用。
- ② 空白孔：取 10 μ L 反应工作液加入空白孔中。
总酶活孔：取 10 μ L 反应工作液加入总酶活孔中。
非特异性酶活孔：取 10 μ L 反应工作液加入非特异性酶活孔中。
- ③ 向步骤②中各孔依次加入 90 μ L 试剂八。
- ④ 向步骤③空白孔加入 20 μ L 试剂二，总酶活孔加入 20 μ L 总酶活样本，非特异性酶活孔加入 20 μ L 非特异性酶活样本。
- ⑤ 向步骤④中各孔依次加入 40 μ L 试剂四，振板 5 s (由于酶促反应迅速，建议使用排枪加入试剂四；单孔操作建议 1 次最多操作 4 个孔)。
- ⑥ 酶标仪 550 nm 处分别测定反应开始 10 s 和 70 s 时的 OD 值 A_1 和 A_2 ，计算变化 OD 值 $\Delta A (\Delta A = A_2 - A_1)$ 。

操作表

	空白孔	总酶活孔	非特异性酶活孔
反应工作液(μ L)	10	10	10
试剂八(μ L)	90	90	90
试剂二(μ L)	20	--	--
总酶活样本(μ L)	--	20	--
非特异性酶活样本(μ L)	--	--	20
试剂四(μ L)	40	40	40
振板 5 s，酶标仪 550 nm 处分别测定反应开始 10 s 和 70 s 时的 OD 值 A_1 和 A_2 ，计算变化 OD 值 $\Delta A (\Delta A = A_2 - A_1)$ ，			

本试剂盒检测组织样本时，需测定蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 GBQ162)进行测定。

结果计算

组织样本中线粒体呼吸链复合物III计算公式：

定义：室温条件下，每克线粒体蛋白每分钟还原 1 μmol 的细胞色素 c 定义为一个酶活单位。

$$\text{线粒体呼吸链复合物III酶活} = \frac{(\Delta A_{\text{总}} - \Delta A_{\text{非}}) \times V_1 \times f}{V_2 \times (\epsilon \times d) \times T} \div C_{\text{pr}}$$

(U/gprot)

注解：

$\Delta A_{\text{总}}$ ：总酶活孔变化 OD 值

$\Delta A_{\text{非}}$ ：非特异性酶活孔变化 OD 值

V_1 ：反应体系总体积：0.16 mL

V_2 ：样本加入量：0.02 mL

ϵ ：还原型细胞色素 c 在 550 nm 处的摩尔吸光系数：0.0191 L/ $\mu\text{mol}/\text{cm}$

d ：光径，0.5 cm

T ：反应时间，1 min

f ：样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr} ：线粒体蛋白浓度，gprot/L

附录1 关键数据

技术参数

检测范围	4.45–106.8 U/L	平均批间差	10.0 %
灵敏度	4.45 U/L	平均批内差	5.0 %
平均回收率	100 %		

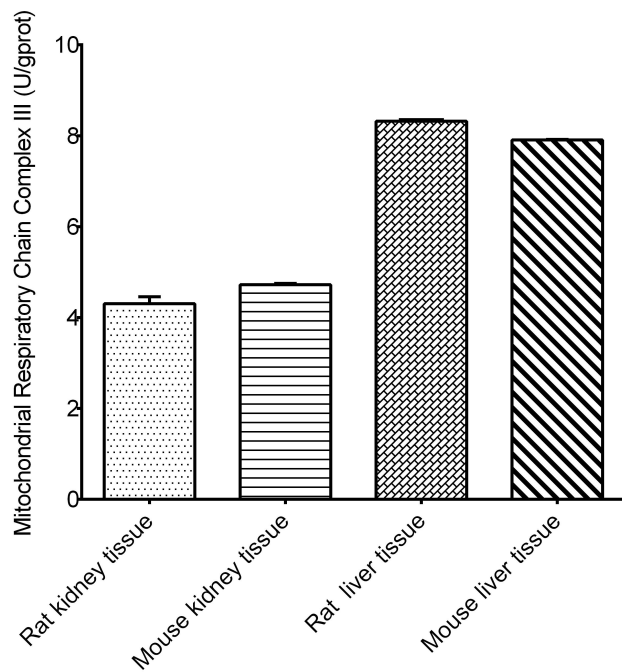
附录2 实例分析

例如检测大鼠肾组织(数据仅供参考):

10%大鼠肾组织线粒体上清液稀释2倍后,按操作表操作,结果如下:空白孔 $A_1=0.198$, $A_2=0.199$, 变化OD值 $\Delta A=0.001$, 说明试剂可用。总酶活孔 $A_1=0.239$, $A_2=0.306$, 变化OD值 $\Delta A_{\text{总}}=0.067$, 非特异性酶活孔 $A_1=0.235$, $A_2=0.289$, 变化OD值 $\Delta A_{\text{非}}=0.054$, 10%大鼠肾组织匀浆线粒体蛋白浓度为5.24 gprot/L计算结果为:

$$\text{线粒体呼吸链复合物III (U/gprot)} = \frac{(0.067 - 0.054) \times 0.16 \times 2}{0.02 \times 0.0191 \times 0.5 \times 1} \div 5.24 = 4.16 \text{ U/gprot}$$

按照说明书操作,测定10%大鼠肾组织(线粒体蛋白浓度为5.24 gprot/L, 稀释2倍,加样量20 μL)、10%小鼠肾组织(线粒体蛋白浓度为6.76 gprot/L, 加样量20 μL)、10%大鼠肝组织(线粒体蛋白浓度为4.05 gprot/L, 加样量20 μL)和10%小鼠肝组织(线粒体蛋白浓度为5.12 gprot/L, 加样量20 μL)中线粒体呼吸链复合物III酶活(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本测不出值	加入试剂四后未振板混匀	加入试剂四后振板混匀反应体系
	试剂七工作液失效	重新配制试剂七工作液

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

