

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：GBQ243

产品规格：48T(46 samples)/ 96T(94 samples)

检测仪器：酶标仪(540-560 nm)

**Elabscience®细胞线粒体呼吸链复合物III
(辅酶 Q-细胞色素 C 还原酶)比色法试剂盒**
**Cell 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细胞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。

本试剂盒检测细胞样本时，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 (Extraction Solution)	25 mL×1 瓶	50 mL×1 瓶	-20°C 保存 3 个月
试剂二 (Reagent 2)	抑制剂 (Inhibitor)	0.8 mL×1 支	0.8 mL×2 支	-20°C 避光 保存 3 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 A (Substrate A)	3 mL×1 瓶	6 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 3 个月
试剂四 (Reagent 4)	稀释液 (Diluent)	7 mL×1 瓶	14 mL×1 瓶	-20°C 保存 3 个月
试剂五 (Reagent 5)	底物 B (Substrate B)	0.8 mL×1 支	1.6 mL×1 支	-20°C 避光 保存 3 个月
试剂六 (Reagent 6)	稳定剂 (Stabilizer)	粉剂×3 支	粉剂×6 支	-20°C 避光 保存 3 个月
试剂七 (Reagent 7)	缓冲液 (Buffer Solution)	13 mL×1 瓶	26 mL×1 瓶	-20°C 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，试剂五在使用前于37°C至少放置10 min，混匀至澄清待用，分装后-20°C保存1个月。

② 试剂六工作液配制：

使用前取一支试剂六加入2 mL试剂四溶解，混匀，置于冰上避光，6 h内使用有效。

③ 试剂五工作液的配制：

根据用量，按照试剂六工作液：试剂五=1：2的体积比混合，室温避光静置3 min后立即使用，配好的试剂五工作液为乳白色悬浊液，在30 min使用有效。

④ 反应工作液的配制

按照试剂五工作液：试剂七：试剂三 =1：9：4的体积比配制成反应工作液。

样本准备

① 样本处理

细胞样本：收集 1×10^6 细胞样本加入0.2 mL试剂一，4 μ L试剂二，振荡混匀，超声破碎(冰浴，功率200 W，超声5 s，间隔10 s，重复15次)， $10000 \times g$ 低温离心3 min，弃沉淀取上清待测，留取部分上清用于蛋白浓度测定。

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：0.73-29.3 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
1×10^6 Jurkat 细胞	不稀释	3×10^6 4T1 细胞	不稀释
1×10^6 HeLa 细胞	不稀释	6×10^6 CHO 细胞	不稀释
4×10^6 K562 细胞	不稀释	1×10^6 293T 细胞	不稀释

注：稀释液为试剂一。

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，酶活降低，样本测定结果偏小。
- ② 加入反应工作液后在 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 ΔA 应在 ± 0.005 以内，说明试剂可用，如果超过该范围，需检查试剂五是否澄清，延长孵育时间。
- ④ 反应工作液使用前须轻微混匀，不可剧烈振摇，否则会出现析出的情况。

操作步骤

- ① 取 40 μL 试剂一加入到各空白孔中。
取 40 μL 待测样本加入到测定孔中。
- ② 向步骤①的各孔中加入 240 μL 的反应工作液。
- ③ 振板 5 s，酶标仪 550 nm 处分别测定反应开始 10 s 和 5 min 时的 OD 值 A_1 和 A_2 ，计算变化 OD 值 ΔA ($\Delta A = A_2 - A_1$)。

操作表

	空白孔	测定孔
试剂一(μL)	40	--
待测样本(μL)	--	40
反应工作液(μL)	240	240
振板 5 s，酶标仪 550 nm 处分别测定反应开始 10 s 和 5 min 时的 OD 值 A_1 和 A_2 ，计算变化 OD 值 ΔA ($\Delta A = A_2 - A_1$)。		

本试剂盒检测细胞样本时，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

细胞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。

$$\text{线粒体呼吸链复合物III酶活 (U/gprot)} = \frac{(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times V_1 \times f}{V_2 \times (\varepsilon \times d) \times T} \div C_{\text{pr}}$$

注解：

$\Delta A_{\text{测定}}$ ：测定孔变化 OD 值

$\Delta A_{\text{空白}}$ ：空白孔变化 OD 值

V_1 ：反应体系总体积，0.28 mL

V_2 ：样本加入量，0.04 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，5 min

f ：样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr} ：样本蛋白浓度，gprot/L

附录 1 关键数据

技术参数

检测范围	0.73-29.3 U/L	批间差	4.5-10.0 %
灵敏度	0.73 U/L	批内差	3.5-5.0 %
回收率	99-104 %		

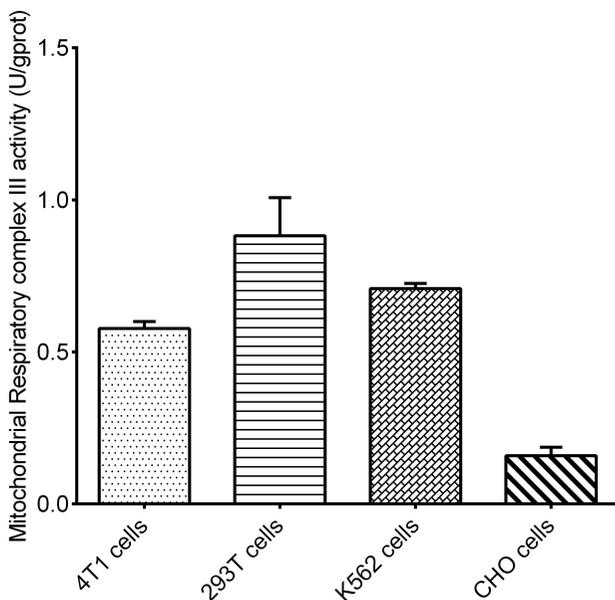
附录2 实例分析

例如检测4T1细胞(数据仅供参考):

取20 μL 的4T1细胞线粒体上清液按操作表操作, 结果如下: 空白孔 $A_1 = 0.563$, $A_2 = 0.564$, 变化OD值 $\Delta A_{\text{空白}} = 0.001$, 说明试剂可用。测定孔 $A_1 = 0.625$, $A_2 = 0.638$, 变化OD值 $\Delta A = 0.013$, 4T1细胞匀浆线粒体蛋白浓度为3.18 gprot/L 计算结果为:

$$\text{线粒体呼吸链复合物III} \frac{(\text{U/gprot})}{=} = \frac{(0.013 - 0.001) \times 0.28}{0.04 \times 0.0191 \times 0.5 \times 5} \div 3.18 = 0.553 \text{ U/gprot}$$

按照说明书操作, 测定 3×10^6 个4T1细胞(线粒体蛋白浓度为3.18 gprot/L , 加样量40 μL)、 1×10^6 个293T细胞(线粒体蛋白浓度为2.91 gprot/L , 加样量40 μL)、 4×10^6 个K562细胞(线粒体蛋白浓度为4.45 gprot/L , 加样量40 μL)和 6×10^6 个CHO细胞(线粒体蛋白浓度为7.83 gprot/L , 加样量40 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
样本未测出值	试剂六工作液失效	重新配制试剂六工作液

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同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。