



线粒体复合体III/CoQ-细胞色素C还原酶试剂盒

可见分光光度法

货号: R45014-24S/48S

产品简介:

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。

还原型细胞色素C 在550nm 有特征光吸收, 线粒体复合体III催化氧化型细胞色素C生成还原型细胞色素C, 因此550nm 光吸收增加速率能够反映线粒体复合体III酶活性。

试剂盒组分与配制:

试剂名称	R45014-24S	R45014-48S	保存要求	备注
试剂一	液体30mL×1瓶	液体60mL×1瓶	-20℃ 保存	
试剂二	液体5mL×1瓶	液体10mL×1瓶	-20℃ 保存	
试剂三	液体μL×1支	液体μL×1支	-20℃ 保存	
试剂四	液体×1瓶	液体×2瓶	-20℃ 保存	
试剂五	粉剂×1支	粉剂×2支	-20℃ 保存	用前把试剂五全部转移至试剂四中, 混匀溶解后备用
试剂六	液体1mL×1支	液体1mL×2支	-20℃ 保存	

所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径1cm)、可调式移液器、低温台式离心机、研钵、冰和蒸馏水。

线粒体复合体III活性测定:

建议正式实验前选取2个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、线粒体制备(提示: 整个线粒体的提取过程须保持4℃低温环境):



①称取约0.1g 组织或收集500万细菌/细胞, 加入1mL 试剂一, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆, 转移至离心管后于4℃×700g 离心10min (若漂浮有脂肪, 可用枪头去除)。

②弃沉淀, 上清液移至另一离心管中, 4℃×12000g 离心10min。沉淀即为提取的线粒体, 用作第④步操作。

③(选做)上步得到的上清液即为胞浆提取物, 可作为样本用于测定从线粒体泄漏的线粒体呼吸链复合体III,用于判断线粒体提取效果。

④在沉淀(线粒体)中加入200 μL试剂二和2μL试剂三, 超声波破碎(冰浴, 功率20%或 200W, 超声3s, 间隔10秒, 重复30次),液体置于冰上用于线粒体复合体III酶活性测定。

【注】:若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为1:5~10的比例进行提取, 或按照细菌/细胞数量(10^4):提取液 (mL) 为500~1000:1的比例进行提取。

2、上机检测:

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若待测上清液比较浑浊(蛋白浓度比较高),可先对样本进行梯度稀释或按照下方加样表梯度减少样本加样量(试剂六相应增加)进行预测定实验。

③将试剂五和六置于37℃(哺乳动物)或25℃(其它物种)于恒温振荡培养箱或水浴锅中孵育15min; 在1mL 玻璃比色皿(光径1cm) 中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管
样本	80
试剂五	600
试剂六	40
混匀, 于550nm处读取A1,置于37℃(哺乳动物)或25℃(其它物种),5min后读取A2,△A=A2-A1。	

结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算:

定义: 每毫克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。



$$\text{复合体III活力}(\text{nmol/min/mg prot})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T$$
$$=82.42 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算:

定义: 每克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。

$$\text{复合体III活力}(\text{nmol/min/g 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T$$
$$=16.65 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌/细胞密度计算:

定义: 每1万个细菌/细胞每分钟催化产生1nmol 还原型细胞色素C 定义为一个酶活单位。

$$\text{复合体III活力}(\text{nmol/min}/10^4\text{cell})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T$$
$$=0.03 \times \Delta A$$

ϵ --还原型细胞色素C 摩尔消光系数, $21.84 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$;

d -- 光径, 1cm;

V ---加入提取液体积, 0.202 mL;

V_1 -- 加入样本体积, 0.08mL;

V_2 ---反应体系总体积, $7.2 \times 10^{-4} \text{L}$;

T -- 反应时间, 5min;

W ---样本质量, g;

500--细胞或细菌总数, 万;

Cpr ---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的BCA蛋白含量检测试剂盒。