

线粒体呼吸链复合体III活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1397

产品规格：100管/48样

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。

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。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体80mL×1瓶	4℃
试剂一	液体20mL×1瓶	4℃
试剂二	粉剂×1支	-20℃
试剂三	液体2.5mL×1瓶	4℃

溶液的配制：

工作液的配制：临用前把试剂二转移到试剂一中混合溶解，用不完的试剂4℃可保存一周。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板（非聚苯乙烯材质）、研钵/匀浆器、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）

- 称取约0.1g组织或收集500万细胞，加入1.0mL提取液，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 4℃ 600 g离心10min。将上清液移至另一离心管中，4℃ 11000 g离心15min。
- 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）。
- 在沉淀中加入200μL提取液，超声波破碎（功率20%，超声5秒，间隔10秒，重复15次），用于复合体III酶活性测定，并且用于蛋白含量测定。

二、测定步骤

- 可见分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至550nm，蒸馏水调零。
- 操作表：在微量玻璃比色皿或96孔板中分别加入

试剂名称(μL)	测定管	对照管
工作液	160	160
试剂三	20	-
37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）准确孵育2min，之后分别加入		
样本	20	20
蒸馏水	-	20
立即混匀，记录550nm处初始吸光值A1和2min 的吸光值A2，分别记为A1测定、A2测定，A1对照、A2对照。计算 $\Delta A = (A2_{测定} - A1_{测定}) - (A2_{对照} - A1_{对照})$ 。		



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

三、复合体III活力单位的计算

1. 按微量玻璃比色皿计算:

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)=[$\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] \div (Cpr \times V样) \div T=261 \times $\Delta A \div$ Cpr

V反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : 细胞色素C摩尔消光系数, 1.91×10^4 L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V样: 加入样本体积, 0.02mL; T: 反应时间, 2min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; 10^9 : 单位换算系数, $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。

2. 按96孔板计算:

将上述公式中的d-1cm改为d-0.6cm进行计算即可。

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100管反应。
7. 附:使用样本重量计算公式: (样本检测数为100T/24S)

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)=[$\Delta A1 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] \div (W \div V提取 \times V样) \div T=262 \times $\Delta A1 \div$ W

$\Delta A1$: 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, 1.91×10^4 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)=[$\Delta A2 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] \div (W \div V提取 \times V样) \div T=52 \times $\Delta A2 \div$ W

$\Delta A2$: 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, 1.91×10^4 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 $\Delta A1 \div$ W + 52 \times $\Delta A2 \div$ W

D、以96孔板计算:

将上述公式中的d-1cm改为d-0.6cm进行计算即可。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com