

线粒体呼吸链复合体III活性检测试剂盒（可见分光光度法）

产品货号：BA1396

产品规格：25管/12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20mL×1瓶	4°C
试剂一	液体20mL×1瓶	4°C
试剂二	粉剂×1支	-20°C
试剂三	液体3mL×1支	4°C

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°C可保存一周。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL玻璃比色皿、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°C 600 g离心10min。将上清液移至另一离心管中，4°C 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

- 可见分光光度计预热30min以上，调节波长至550nm，蒸馏水调零。
- 操作表：在1mL玻璃比色皿中分别加入

试剂名称(μL)	测定管	对照管
工作液	800	800
试剂三	100	-
37°C（哺乳动物）或25°C（其它物种）准确孵育2min，之后分别加入		
样本	100	100
蒸馏水	-	100
立即混匀，记录550nm处初始吸光值A1和2min后吸光值A2，分别记为A1测定、A2测定，		



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

A1对照、A2对照。计算 $\Delta A = (A2\text{测定} - A1\text{测定}) - (A2\text{对照} - A1\text{对照})$ 。

三、复合体III活力单位的计算

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)=[$\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 262 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

V反总：反应体系总体积，0.001L； ϵ ：细胞色素C摩尔消光系数， $1.91 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$ ；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.1mL；T：反应时间，2min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； 10^9 ：单位换算系数， $1\text{mol} = 10^9 \text{nmol}$ 。

注意事项：

1. 尽量保持比色皿内反应液温度在37°C或25°C。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°C（哺乳动物）或25°C（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25管反应。
7. 附:使用样本重量计算公式：（样本检测数为25T/6S）

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

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

$\Delta A2$ ：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， $1.91 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$ ；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) = $262 \times \Delta A1 \div W + 52 \times \Delta A2 \div W$



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com