

## 线粒体复合体III/CoQ-细胞色素C还原酶试剂盒(分光法)

产品货号: BA3391

产品规格: 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。

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。

### 产品内容:

| 产品名称 | 规格        | 保存条件     | 注意事项  |
|------|-----------|----------|---|
| 试剂一  | 液体60mL×1瓶 | 2-8℃     |   |
| 试剂二  | 液体10mL×1瓶 | 2-8℃     |   |
| 试剂三  | 液体1支      | -20℃, 避光 |   |
| 试剂四  | 液体2瓶      | 2-8℃     |   |
| 试剂五  | 粉剂2支      | -20℃, 避光 | 1. 用前把一支试剂五全部转移至一瓶试剂四中, 混匀溶解后备用;<br>2. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |
| 试剂六  | 液体2mL×2支  | -20℃, 避光 |   |

### 实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、1ml比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

### 指标测定:

建议先选取1-3个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

#### 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0.2g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200μL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. 检测步骤:

- ①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



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

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°C（哺乳动物）或 25°C（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：

| 试剂组分（ $\mu\text{L}$ ）   | 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°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种），5min 后读取 A2， $\Delta A=A2-A1$ 。 |     |

**【注】** 1.若 $\Delta A$  的值在零附近徘徊，可以增加样本加样体积 V1（如 120 $\mu\text{L}$ ，试剂五相应减少），或延长反应时间 T（如增至 10min 或更长），则改变后的 V1 和 T 需代入计算公式重新计算。

### 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。

复合体 III 活力(nmol/min/mg prot)=[ $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$ ]  $\div$  (V1  $\times$  Cpr)  $\div$  T=82.42  $\times$   $\Delta A \div$  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。

复合体 III 活力(nmol/min/g 鲜重)=[ $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$ ]  $\div$  (W  $\times$  V1  $\div$  V)  $\div$  T=82.42  $\times$   $\Delta A \div$  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 定义为一个酶活力单位。

复合体 III 活力(nmol/min/ $10^4$  cell)=[ $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$ ]  $\div$  (500  $\times$  V1  $\div$  V)  $\div$  T=0.165  $\times$   $\Delta A$

$\epsilon$ ---还原型细胞色素 C 摩尔消光系数， $21.84 \times 10^3$  L/mol/cm；d---96 孔板光径，1cm；

V---加入提取液体积，0.202 mL； V1---加入样本体积，0.08mL； V2---反应体系总体积， $7.2 \times 10^{-4}$ L；

T---反应时间，5min； W---样本质量，g； 500---细胞或细菌总数，500 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。



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