

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; 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:



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

试剂组分 (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°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种), 5min 后读取 A2, ΔA=A2-A1。	

【注】 1.若ΔA 的值在零附近徘徊, 可以增加样本加样体积 V1 (如 120μL, 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。

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

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。

$$\text{复合体 III 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 82.42 \times \Delta A \div W$$

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。

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

ε---还原型细胞色素 C 摩尔消光系数, $21.84 \times 10^3 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$; 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, $7.2 \times 10^{-4}\text{L}$;

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

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