

线粒体呼吸链复合体 II /琥珀酸-辅酶 Q 还原酶活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 65mL×2 瓶	2-8℃保存
提取液二	液体 22mL×1 瓶	-20℃保存
试剂一	液体 16mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	粉剂×2 支	2-8℃保存
试剂四	液体 2.5mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	液体 1.5mL×1 支	2-8℃保存

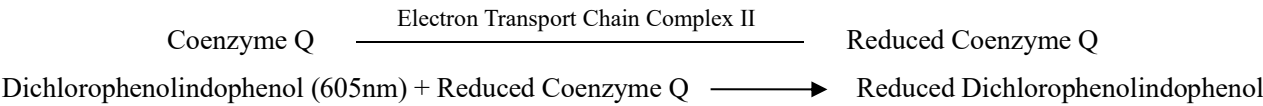
溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 0.1mL 丙酮，丙酮易挥发，使用完毕后注意封口，-20℃可保存 2 个月；
- 2、试剂二工作液：临用前根据样本量将试剂二：丙酮=10μL:1mL（约 100T）混合备用，现用现配；
- 3、试剂三：临用前取 1 支加入 1mL 丙酮，充分溶解，用不完的试剂-20℃分装可保存 4 周（1 瓶粉剂溶解后可做 100T，为延长试剂盒使用时间，此产品多给 1 支粉剂），注意封口；
- 4、工作液的配制：临用前根据样本量将丙酮：试剂二工作液：试剂三=0.25mL： 0.5mL： 0.25mL（1mL，约 50T）混合备用，现用现配。

产品说明：

线粒体呼吸链复合体II又称琥珀酸-辅酶Q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，催化琥珀酸氧化生成延胡索酸，同时辅基FAD还原为FADH₂，后者进一步还原氧化型辅酶Q生成还原型辅酶Q，是呼吸电子传递链的支路。

复合体II的催化产物还原型辅酶Q可进一步还原2,6-二氯吲哚酚，2,6-二氯吲哚酚在605nm有特征吸收峰，通过检测2,6-二氯吲哚酚的减少速率来计算该酶活性。



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。

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/恒温培养箱、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器、细胞超声破碎仪、丙酮、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）

- 1. 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞，加入 1.0 mL 提取液一，用匀浆器或研钵于冰上匀浆。
- 2. 4℃ 600 g 离心 10min。将上清液移至另一离心管中，4℃ 11000 g 离心 15min，得到上清液和沉淀。
- 3. 上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的复合体II（此步可选做，可以判断线粒体提取效果）。
- 4. 在沉淀中加入 200μL 提取液一和 200μL 提取液二，超声波破碎（功率 200W，超声 5 秒，间隔 10 秒，重复 15 次），用于复合体II活性测定，若用蛋白浓度计算，取 20μL 用于蛋白含量测定。

二、测定步骤

- 1、可见分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至605nm，可见分光光度计蒸馏水调零。
- 2、将试剂一37℃预热15min。
- 3、操作表：在微量玻璃比色皿/96孔板中分别加入：

试剂名称（μL）	测定管
样本	10
试剂一	140
工作液	20
试剂四	20
试剂五	10
充分混匀后于605nm处测定10s时的吸光值A1，迅速置于37℃准确反应5min（酶标仪有控温功能的将温度调节至37℃），迅速取出测定5min10s时的吸光度A2，计算ΔA=A1-A2。	

三、复合体II活性的计算

1. 以微量玻璃比色皿计算：

- （1）按样本蛋白浓度计算
- 单位定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟消耗 1nmol 2,6-二氯吲哚酚定义为一个酶活力单位。
- 复合体II活性（U/mg prot）= $[\Delta A \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{样} \times C_{pr}) \div T = 190.5 \times \Delta A \div C_{pr}$
- V反总：反应体系总体积，2×10⁻⁴L；ε：2,6-二氯吲哚酚摩尔消光系数，2.1×10⁴L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；
- V样：加入样本体积，0.01mL；T：反应时间，5min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol。

2. 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。

注意事项：

- 1、为保证实验结果的准确性，需先取1-2个样做预实验，如果测定的吸光值大于1.2（微量比色皿）/0.8（96孔板），可用蒸馏水稀释上清液后再测定。计算结果时注意乘以稀释倍数。若ΔA大于0.6（微量比色皿）/0.4（96孔板），需将样本稀释适当倍数（计算公式中乘以相应稀释倍数）；若ΔA偏小，则可以通过增加加入的样本体积来提高灵敏度。
- 2、样本蛋白浓度需自行测定。由于提取液一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重悬试剂（提取液一+提取液二）本身的蛋白含量（约0.5mg/mL）。
- 3、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。

4、附：使用样本重量计算公式：（样本检测数为 50T/24S）

A、上清中复合体II活性的计算：

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟消耗 1nmol 2,6-二氯吡啶酚定义为一个酶活力单位。

复合体II活性 (U/g 质量) = $[\Delta A1 \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V \text{ 提取} \times V \text{ 样}) \div T = 190.5 \times \Delta A1 \div W$

B、沉淀中复合体II活性的计算：

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟消耗 1nmol 2,6-二氯吡啶酚定义为一个酶活力单位。

复合体II活性 (U/g 质量) = $[\Delta A2 \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V \text{ 重悬} \times V \text{ 样}) \div T = 76.2 \times \Delta A2 \div W$

C、样本复合体II总活性的计算：

样本复合体II总活性即为上清中复合体II活性与沉淀中复合体II活性之和。

复合体II总活性 (U/g 质量) = $190.5 \times \Delta A1 \div W + 76.2 \times \Delta A2 \div W$

$\Delta A1$ ：上清测定值； $\Delta A2$ ：沉淀测定值；V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{L}$ ； ϵ ：2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数， $2.1 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$ ；d：比色皿光径，1cm；V 提取：样本匀浆加入提取液一的体积，1mL；V 重悬：沉淀重悬加入提取液一和提取液二的总体积，0.4mL；V 样：加入样本体积，0.01mL；T：反应时间，5min；W：样本重量，g； 10^9 ：单位换算系数， $1 \text{mol} = 10^9 \text{nmol}$ 。

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。

5、附：使用细胞数量计算公式：（样本检测数为 50T/24S）

A、上清中复合体II活性的计算：

单位的定义：每 10^6 个细胞在反应体系中每分钟消耗 1nmol 2,6-二氯吡啶酚定义为一个酶活力单位。

复合体II活性 (U/ 10^6 cell) = $[\Delta A1 \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \div V \text{ 提取} \times V \text{ 样}) \div T = 190.5 \times \Delta A1 \div N$

B、沉淀中复合体II活性的计算：

单位的定义：每 10^6 个细胞在反应体系中每分钟消耗 1nmol 2,6-二氯吡啶酚定义为一个酶活力单位。

复合体II活性 (U/ 10^6 cell) = $[\Delta A2 \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \div V \text{ 重悬} \times V \text{ 样}) \div T = 76.2 \times \Delta A2 \div N$

C、样本复合体II总活性的计算：

样本复合体II总活性即为上清中复合体II活性与沉淀中复合体II活性之和。

复合体II总活性 (U/ 10^6 cell) = $190.5 \times \Delta A1 \div N + 76.2 \times \Delta A2 \div N$

$\Delta A1$ ：上清测定值； $\Delta A2$ ：沉淀测定值；V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{L}$ ； ϵ ：2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数， $2.1 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$ ；d：比色皿光径，1cm；V 提取：样本匀浆加入提取液一的体积，1mL；V 重悬：沉淀重悬加入提取液一和提取液二的总体积，0.4mL；V 样：加入样本体积，0.01mL；T：反应时间，5min；N：细胞数量，以 10^6 计； 10^9 ：单位换算系数， $1 \text{mol} = 10^9 \text{nmol}$ 。

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。