

线粒体呼吸链复合体 II 活性检测试剂盒说明书

Mitochondrial Respiratory Chain Complex II Activity Assay Kit

微量法

货号: AK068

规格: 25T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 1	45mL × 1 瓶	4℃保存;
提取液 2	6mL × 1 瓶	-20℃保存;
AK068-A	20mL × 1 瓶	4℃保存; 若试剂有析出, 取上清溶液使用即可;
AK068-B	粉剂 × 1 支	-20℃保存; 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); 然后根据用量用丙酮 100 倍稀释后使用, 现用现配;
AK068-C	粉剂 × 1 支	4℃保存; 临用前取一支加入 1mL 丙酮溶解备用; 用不完的试剂-20℃分装保存 4 周;
工作液配制: 临用前根据用量将丙酮、AK069-B (稀释后) 和 AK069-C 按 1:2:1 比例混合, 现用现配;		
AK068-D	3mL × 1 瓶	4℃保存;
AK068-E	1.5mL × 1 瓶	4℃保存;

简介:

意义: 线粒体复合体 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。

原理: 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。

自备用品:

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、丙酮、细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

样本的前处理:

1. 准确称取 0.1g 组织或收集 500 万细胞, 加入 1mL 提取液 1, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
2. 将匀浆 600g, 4℃离心 10min。弃沉淀, 将上清液移至另一离心管中, 11000g, 4℃离心 15min, 得到上清液和沉淀。
3. 上清液即为除去线粒体的胞浆蛋白, 可用于测定从线粒体泄漏的复合体 II (此步可选做)。
4. 步骤 2 中得到的沉淀即为线粒体, 加入 200uL 提取液 1 和 200uL 提取液 2, 超声波破碎 (冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 5s, 间隔 10 秒, 重复 15 次), 用于线粒体复合体 II 酶活性测定, 并且用于蛋白含量测定。

测定步骤:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 605nm, 蒸馏水调零。
2. 将 AK068-A 于 37℃预热 15min。
3. 样本测定, 在 1ml 玻璃比色皿中按照下表操作:

试剂名称	测定管(ul)
样本	50
AK068-A	700
工作液	100
AK068-D	100
AK068-E	50
将上述试剂分别加入比色皿/96孔板后迅速吹打混匀，记录第10s的吸光值A1，迅速将比色皿连同反应液一起放入37℃水浴中准确反应5分钟（酶标仪有控温功能的将温度调节至37℃），之后迅速取出记录5min10s时的吸光度A2，计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。	

线粒体复合体II活力单位的计算

a.按微量比色皿计算：

1. 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 2,6-二氯吡啶酚定义为一个酶活力单位。

复合体II活性 (U/mg prot) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$

= $190.5 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))

V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数， 2.1×10^4 L/mol/cm；

d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.05mL；T：反应时间，5min；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. 按样本鲜重计算(检测样本数为 25T/12S)

单位的定义：每 g 组织每分钟消耗 1 nmol 2,6-二氯吡啶酚定义为一个酶活力单位。

复合体II活性 1 (U/g 质量) = $[\Delta A1 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V_{\text{提取}} \div V_{\text{样本}}) \div T$

= $190.5 \times \Delta A1 \div W$

复合体II活性 2 (U/g 质量) = $[\Delta A2 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V_{\text{重悬}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 76.2 \times \Delta A2 \div W$

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

注： $\Delta A1$ ：上清测定值； $\Delta A2$ ：沉淀测定值；V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数， 2.1×10^4 L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.05mL；V 提取：加入提取液1体积，1mL；V 重悬：沉淀重悬体积，0.4 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g； 10^9 ：单位换算系数， $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。

3. 按细胞数量计算(检测样本数为 25T/12S)

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

复合体II活性 1 (U/ 10^6 细胞) = $[\Delta A1 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \div V_{\text{提取}} \div V_{\text{样本}}) \div T = 190.5 \times \Delta A1 \div N$

复合体II活性 2 (U/ 10^6 细胞) = $[\Delta A2 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \div V_{\text{重悬}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 76.2 \times \Delta A2 \div N$

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

注： $\Delta A1$ ：上清测定值； $\Delta A2$ ：沉淀测定值；V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数， 2.1×10^4 L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.05 mL；V 提取：加入提取液1体积，1mL；V 重悬：沉淀重悬体积，0.4 mL；T：反应时间，5 min；N：细胞数量，以 10^6 计； 10^9 ：单位换算系数， $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。

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，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，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 1+提取液 2）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。