

## 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

可见分光光度法

货号: AK068

规格: 25T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK068-提取液	45mL×1 瓶	4℃保存;
AK068-A	40mL×1 瓶	4℃保存;
AK068-B	粉剂×1 支	-20℃保存; 溶于 1 mL 丙酮, 可分装后-20℃保存; 临用前再用丙酮 100 倍稀释后使用;
AK068-C	粉剂×1 支	4℃保存; 临用前加入 2 mL 丙酮溶解备用;
工作液配制: 临用前把 AK068-B 和 AK068-C 按 1: 1 混合, 现用现配;		
AK068-D	2.5mL×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 FADH<sub>2</sub>, 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、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 AK068-提取液, 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。
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 4 中的沉淀即为线粒体, 加入 400uL AK068-提取液, 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. 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 605nm, 蒸馏水调零。
2. 将 AK068-A 于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其他物种) 预热 15min。
3. 样本测定, 在 EP 管中按照下表操作:

试剂名称	测定管(ul)
样本	50
AK068-A	750
工作液	100
AK068-D	100

立即混匀, 记录第 10s 的吸光值 A<sub>1</sub>, 迅速将比色皿连同反应液一起放入 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (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 A2，计算  $\Delta A=A1-A2$ 。

### 线粒体复合体 II 活力单位的计算

#### 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。

$$\text{复合体 II 活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ = 476.2 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

※ 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， $10^{-3}$ L； $\epsilon$ ：2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数， $2.1 \times 10^4$ 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，2min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； $10^9$ ：单位换算系数， $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。

#### 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。

$$\text{复合体 II 活性 1 (U/g 质量)} = [\Delta A1 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V_{\text{提取 1}} \div V_{\text{样本}}) \div T = \\ 476.2 \times \Delta A1 \div W$$

$$\text{复合体 II 活性 2 (U/g 质量)} = [\Delta A2 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V_{\text{提取 2}} \times V_{\text{样本}}) \\ \div T = 190.5 \times \Delta A2 \div W$$

$$\text{复合体 II 总活性 (U/g 质量)} = 476.2 \times \Delta A1 \div W + 190.5 \times \Delta A2 \div W$$

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， $10^{-3}$  L； $\epsilon$ ：2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数， $2.1 \times 10^4$  L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.04 mL；V 提取 1：加入提取液体积，1mL；V 提取 2：沉淀重悬体积，0.4 mL；T：反应时间，2 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， $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。

### 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，如果测定的吸光值过高（高于 1.5），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  $\Delta A$  大于 0.4，需将样本稀释适当倍数（计算公式中乘以相应稀释倍数）；若  $\Delta A$  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提取液本身的蛋白含量。
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。