

线粒体复合体 II 试剂盒说明书

(微板法 96 样)

一、产品简介:

线粒体复合体II (EC 1.3.5.1) 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, 是控制琥珀酸氧化呼吸链反应的第一步, 也是氧化磷酸化产能过程的关键。

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, 使该物质在 600nm 处的吸光值减小, 通过检测 600nm 处的下降速率进而得到复合体II酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 120mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 0.5mL×1 支	4°C保存	
试剂四	粉剂×1 支	4°C保存;	临用前甩几下使粉末全部落入底部, 加入 2mL 蒸馏水, 混匀溶解备用。
试剂五	粉剂×1 支	4°C保存;	临用前甩几下使粉末全部落入底部, 加入 2mL 蒸馏水混匀溶解 (溶解后的可以-20 度分装保存), 检测使用前需再用蒸馏水稀释 5 倍后使用。
试剂六	粉剂×1 支	-20°C保存	临用前甩几下使粉末全部落入底部, 加入 0.55mL 无水乙醇, 完全溶解后再加入 0.55mL 的蒸馏水, 混匀备用。
试剂七	液体 16mL×1 瓶	4°C保存	

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、低温台式离心机、研钵、冰和蒸馏水。

四、线粒体复合体 II 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、线粒体制备 (提示: 整个线粒体的提取过程须保持 4°C低温环境):

- ① 称取约 0.1g 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°C×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°C×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 II, 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 II 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 (10⁴): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min 以上，设定温度 25℃，调节波长至 600nm。
- 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（试剂七相应增加）进行预测定实验。
- ③ 将试剂四和五和六和七置于 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 96 孔板中依次加入：

试剂名称（ μL ）	测定管
试剂四	18
试剂五	18
试剂六	10
试剂七	144
样本	10
混匀，立即于 600nm 处读取 A1，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种），10min 后读取 A2， $\Delta A=A1-A2$ 。	

- 【注】** 1. 若 A1 值小于 0.4，则可减少样本加样体积 V1（如减至 5 μL ，试剂七相应增加），则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。
2. 若 ΔA 的值在零附近徘徊，可增加样本加样体积 V1（如增至 20 μL ，试剂七相应减少），或延长反应时间 T，则改变后的 V1 和 T 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟消耗 1nmol 的 2,6-二氯吡嗪酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体II活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 190.5 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟消耗 1nmol 的 2,6-二氯吡嗪酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体II活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 38.5 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌/细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌/细胞每分钟消耗 1nmol 的 2,6-二氯吡嗪酚定义为一个酶活单位。

$$\text{复合体II活力}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.077 \times \Delta A$$

ϵ ---2,6-二氯吡嗪酚摩尔消光系数， $2.1 \times 10^4 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$ ；

d---96 孔板光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，0.202mL；

V1---加入样本体积，0.01mL；

反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

T---反应时间，10min；

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。