

## 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: AK069

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK069-A	100mLx1 瓶	-20℃保存;
AK069-B	20mLx1 支	-20℃保存;
AK069-C	1.5mlx1	-20℃保存;
AK069-D	25mLx1 瓶	4℃保存;
AK069-E	粉剂x1 支	-20℃保存;
工作液的配制: 临用前把 AK069-E 转移到 AK069-D 中混合溶解, 置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 孵育 5min; 用不完的试剂 4℃可保存一周;		
AK069-F	2.5mLx1 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/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水

样本的前处理:

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离:

- 准确称取 0.1g 组织或收集 500 万细菌或细胞, 加入 1mL AK069-A 和 10uL AK069-C, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 将匀浆 600g, 4℃离心 5min。弃沉淀, 将上清液移至另一离心管中, 11000g, 4℃离心 10min。
- 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)。
- 步骤 4 中的沉淀即为线粒体, 加入 200uL AK069-B 和 2uL AK069-C, 超声波破碎(冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10 秒, 重复 30 次), 用于线粒体复合体 II 酶活性测定。

测定步骤:

- 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 605nm, 蒸馏水调零。
- 在微量石英比色皿或 96 孔板中按照下表操作

试剂名称	测定管(ul)
样本	10
AK069-F	25
工作液	200
立即混匀, 记录 605nm 处初始吸光值 A1 和 2min 后的吸光值 A2, 计算 $\Delta A=A1-A2$ 。	

## 线粒体复合体 II 活力单位的计算

### a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下:

#### (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。

$$\text{复合体 II 活力 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 559 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

#### (2) 按样本鲜重计算

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。

$$\text{复合体 II 活力 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 113 \times \Delta A \div W$$

#### (3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol 2,6-二氯吡啶酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体 II 活力 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.226 \times \Delta A$$

**注:**  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积,  $2.35 \times 10^{-4}$  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;  $V_{\text{样}}$ : 加入样本体积, 0.01 mL;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 0.202 mL;  $T$ : 反应时间, 2 min;  $\text{Cpr}$ : 样本蛋白质浓度, mg/mL;  $W$ : 样本质量(g); 500: 细胞或细菌总数, 500 万。

### b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下:

#### (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。

$$\text{复合体 II 活力 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 1118 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

#### (2) 按样本鲜重计算

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。

$$\text{复合体 II 活力 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 226 \times \Delta A \div W$$

#### (3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol 2,6-二氯吡啶酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体 II 活力 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.452 \times \Delta A$$

**注:**  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积,  $2.35 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : 2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数,  $2.1 \times 10^4$  L / mol / cm;  
 $d$ : 96 孔板光径, 0.5cm;  $V_{\text{样}}$ : 加入样本体积, 0.01 mL;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 0.202mL;  $T$ : 反应时间, 2 min;  $\text{Cpr}$ : 样本蛋白质浓度, mg/mL;  $W$ : 样本质量(g); 500: 细胞或细菌总数, 500 万。