

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	100mL×1 瓶	-20℃保存；
AK069-B	20mL×1 支	-20℃保存；
AK069-C	1.5mL×1	-20℃保存；
AK069-D	25mL×1 瓶	4℃保存；
AK069-E	粉剂×1 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	2.5mL×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/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：

1. 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。
2. 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。
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 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：

1. 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。
2. 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。

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。

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。

复合体 II 活力 (nmol/min/ 10^4 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 反总：反应体系总体积， 2.35×10^{-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，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，0.202 mL；T：反应时间，2 min；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。

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。

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。

复合体 II 活力 (nmol/min/ 10^4 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 反总：反应体系总体积， 2.35×10^{-4} L； ϵ ：2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数， 2.1×10^4 L / mol / cm；
d：96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，0.202mL；T：反应时间，2 min；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。