

线粒体呼吸链复合体 II/琥珀酸-辅酶 Q 还原酶试剂盒

(货号: BP10489W 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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 2,6-二氯吡啶酚, 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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 0.5mL×1 支	-20℃避光保存	
试剂四	粉剂 1 支	4℃避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 0.5ml 无水乙醇溶解, 再加入 1.5ml 蒸馏水, 混匀备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	粉剂 1 支	4℃避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 2mL 蒸馏水混匀溶解, 检测使用前需再用蒸馏水稀释 5 倍后使用; 3. 溶解后的试剂可以-20 度分装保存。
试剂六	粉剂 1 支	-20℃避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 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; 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂七	液体 16mL×1 瓶	4℃避光保存	

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、线粒体制备(提示: 整个线粒体的提取过程须保持 4℃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℃×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℃×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、检测步骤：

- 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：

试剂组分（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 5μL，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 20μL，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 2,6-二氯吡啶酚定义为一个酶活力单位。

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

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)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$] ÷ (W × V1 ÷ V) ÷ T = 38.5 × $\Delta A \div W$

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 2,6-二氯吡啶酚定义为一个酶活单位。

复合体II活力(nmol/min/10⁴ cell)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9$] ÷ (500 × V1 ÷ V) ÷ T = 0.077 × ΔA

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---加入提取液体积，0.202mL；

V1---加入样本体积，0.01mL；

V2---反应体系总体积, 2×10^{-4} 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。