

## 线粒体复合体 II 试剂盒说明书

(货号: G0846F24 分光法 24 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 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 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 5mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 μL×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 2.1mL 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 0.6mL 无水乙醇, 完全溶解后再加入 0.6mL 的蒸馏水, 混匀备用。
试剂七	液体 15mL×1 瓶	4°C保存	

### 三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、可调式移液器、低温台式离心机、研钵、无水乙醇、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。
- 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 (10<sup>4</sup>): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

## 2、上机检测:

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 600nm, 蒸馏水调零。
- 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°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 于恒温振荡培养箱或水浴锅中孵育 15min; 在 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
试剂四	70
试剂五	50
试剂六	40
试剂七	600
样本	40
混匀, 立即于 600nm 处读取 A1, 置于 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种), 10min 后读取 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。	

## 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。

$$\text{复合体II活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 95.2 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

### 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。

$$\text{复合体II活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 19.2 \times \Delta A \div W$$

### 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。

$$\text{复合体II活力}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.038 \times \Delta A$$

$\epsilon$ ---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---光径, 1cm;

V---加入提取液体积, 0.202mL;

V1---加入样本体积, 0.04mL;

V2---反应体系总体积,  $8 \times 10^{-4} \text{ L}$ ;

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。