

线粒体复合体 II 试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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。

测定原理：

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。

需自备的仪器和用品：

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。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，-20℃ 保存；

试剂二：液体 20mL×1 瓶，-20℃ 保存；

试剂三：液体 1.5mL×1 支，-20℃ 保存；

试剂四：液体 25mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂五：粉剂×1 支，-20℃ 保存；

试剂六：液体 2.5mL×1 瓶，4℃ 保存；

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 万细胞，加入 1mL 试剂一和 10uL 试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 2、将匀浆 600g，4℃ 离心 5min。
- 3、弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃ 离心 10min。
- 4、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）。
- 5、步骤④中的沉淀即为线粒体，加入 200uL 试剂二和 2uL 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），用于复合体 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、样本测定

（1）工作液的配制：临用前把试剂五转移到试剂四中混合溶解，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）孵育 5min；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

（2）在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μL 样本、25 μL 试剂六和 200 μL 工作液，立即混匀，记录 605nm 处初始吸光值 A1 和 2min 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

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)=[$\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 559 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$
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)=[$\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.226 \times \Delta A$

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)=[$\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1118 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$
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)=[$\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.452 \times \Delta A$
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，0.202 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。