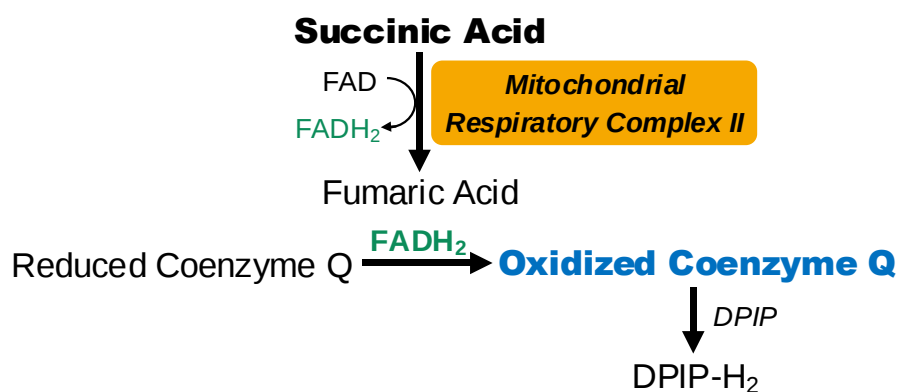




线粒体呼吸链复合体 II 活性检测试剂盒

Mitochondrial Respiratory Complex II Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



线粒体呼吸链复合体 II 活性检测试剂盒

Mitochondrial Respiratory Complex II Activity Assay Kit

一、产品描述

线粒体呼吸链复合体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，FADH₂ 进一步还原氧化型辅酶 Q 生成还原型辅酶 Q，作为呼吸电子传递链的支路，其活性的测定对呼吸电子传递链（ETC）状态分析具有重要意义。

线粒体呼吸链复合体II催化生成的还原型辅酶 Q 能够将 2,6-二氯吡啶酚还原，2,6-二氯吡啶酚在 605 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化计算 2,6-二氯吡啶酚分解速率即可表征复合体 II 的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液 A	液体 80 mL×1 瓶	4°C 保存	-
提取液 B	液体 12 mL×1 瓶	-20°C 保存	-
试剂一	液体 40 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	粉剂×1 支	-20°C 保存	使用前加入 100 μL 丙酮充分溶解 使用后密封保存，配制后-20°C可保存 2 个月 使用前使用丙酮稀释 100 倍即为试剂二应用液
试剂三	粉剂×2 支	4°C 保存	使用前每支加入 1 mL 丙酮充分溶解 (分装后-20°C可保存 1 个月，避免反复冻融)
试剂四	液体 6 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂五	液体 3 mL×1 瓶	4°C 保存	-
检测工作液的配制（现用现配）：根据使用量按试剂二应用液：试剂三：丙酮=2:1:1 的体积比配制，充分混匀即为检测工作液。			

需自备试剂：丙酮（C₃H₆O，MW = 58.08，CAS: 67-64-1）

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿（光径 10 mm）、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱、丙酮和蒸馏水。

1. 样本处理（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

- ①称取 100 mg 组织或收集 500 万细胞，加入 1 mL 提取液 A，使用匀浆器或研钵冰浴研磨至匀浆，匀浆液 4℃ 600 g 离心 10 min，弃沉淀，留上清；
- ②吸取步骤①离心后上清液至另一离心管中，4℃ 12000 g 离心 10 min；
- ③步骤②离心后上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的复合体 II（此步可选做）；
- ④步骤②离心后沉淀中加入 200 μL 提取液 A 和 200 μL 提取液 B，充分振荡混匀，冰浴超声破碎（功率 20%或 200 W，超声 5 s，间隔 10 s，重复 15 次）即为粗酶液，用于线粒体复合体 IV 活性测定（可用于蛋白含量测定）。

2. 测定步骤

- ①分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 605 nm，蒸馏水调零。
- ②试验前将试剂一 37℃预热 15 min。
- ③在 1 mL 玻璃比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)
粗酶液	50
试剂一	700
检测工作液	100
试剂四	100
试剂五	50

- 吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 10 s 时（总时间）605 nm 处吸光值，记为 A1；
②37℃准确反应 300 s，测定 310 s（总时间）时 605 nm 处吸光值，记为 A2；③计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

3. 线粒体呼吸链复合体 II 活性计算

单位定义：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。

$$\text{复合体 II (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{190.48 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

注释：V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.05 mL；V 反总：反应体系总体积，1×10⁻³ L；ε：2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数，2.1×10⁴ L/mol/cm；d：1 mL 玻璃比色皿光径，1 cm；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；10⁹：单位换算系数，1 mol=10⁹ nmol。

四、注意事项

- ①若 A1 大于 1.2 或 ΔA 大于 0.5，将粗酶液适当稀释后再进行测定，计算时相应修改；
- ②提取液 A 中含有约 1 mg/mL 蛋白，测定样本蛋白浓度时需减去提取 A+提取液 B 中的蛋白含量（500 μL 提取液 A+500 μL 提取液 B=0.5 mg/mL）；
- ③准确在规定时间点完成吸光值的测定，以保证结果的准确性和重复性；
- ④为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系；
- ⑤推荐使用样本蛋白浓度计算酶活，若使用样本质量计算，则需加测胞浆提取物酶活，上清和沉淀酶活之和方为总酶活。

附：使用样本质量计算的公式

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 2,6-二氯吲哚酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{上清中复合体 II (U/g)} = \frac{\Delta A1 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{190.48 \times \Delta A1}{W}$$

$$\text{沉淀中复合体 II (U/g)} = \frac{\Delta A2 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{76.19 \times \Delta A2}{W}$$

$$\text{复合体 II (U/g)} = \text{上清中复合体 II} + \text{沉淀中复合体 II} = \frac{190.48 \times \Delta A1}{W} + \frac{76.19 \times \Delta A2}{W}$$

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.05 mL；V 反总：反应体系总体积，1×10⁻³ L；V 提：提取过程中第一次加入提取液 A 的总体积，1 mL；V 样总：沉淀重悬体积，0.4 mL；ε：2,6-二氯吲哚酚摩尔消光系数，2.1×10⁴ L/mol/cm；d：1 mL 玻璃比色皿光径，1 cm；T：反应时间，5 min；Cpr：粗酶液蛋白浓度，mg/mL；10⁹：单位换算系数，1 mol=10⁹ nmol；ΔA1：上清测定值；ΔA2：沉淀测定值。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

Liaodong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

