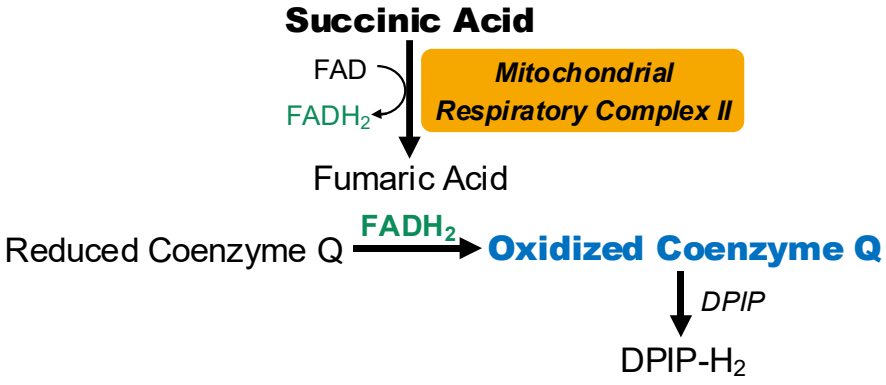
线粒体呼吸链复合体 II 活性检测试剂盒

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.

Catalog Number **AKOP006M**
Storage Temperature **-20°C**
Size **100T/96S**

Microanalysis Methods

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 $FADH_2$，$FADH_2$ 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 2,6-二氯吲哚酚还原，2,6-二氯吲哚酚在 605 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化计算 2,6-二氯吲哚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 65 mL×2 瓶	4℃保存	-
提取液 B	液体 22 mL×1 瓶	-20℃保存	-
提取液 C	液体 0.3 mL×1 支	4℃保存	-
试剂一	液体 16 mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	粉剂×2 支	-20℃保存	**使用前每支加入 2 mL 丙酮充分溶解**（分装后-20℃可保存 1 个月，避免反复冻融）
试剂三	液体 2.5 mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂四	液体 1.5 mL×1 支	4℃保存	-
检测工作液的配制（现用现配）：根据使用量按试剂一：试剂二：试剂三：试剂四=14:2:2:1 的体积比配制，充分混匀即为检测工作液。			

需自备试剂：丙酮（C_3H_6O，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：酶标仪、96 孔板、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。

Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

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、200 μL 提取液 B 和 2 μL 提取液 C，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），4℃ 12000 g 离心 10 min 取上清置于冰上待测。

2.测定步骤

①酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 605 nm。

②试验前将**检测工作液** 37℃预热 15 min。

③在 96 孔板中依次加入下列试剂：

试剂	测定组（μL）
粗酶液	10
检测工作液	190

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ΔA=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 2,6-二氯吲哚酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体 II（U/mg prot）} = \frac{\Delta A \times V_{反总} \times 10^9}{\varepsilon \times d \times V_{样} \times Cpr \times T} = \frac{380.95 \times \Delta A}{Cpr}$$

注释：V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.01 mL；V 反总：反应体系总体积，2×10^{-4} L；ε：2,6-二氯吲哚酚摩尔消光系数，2.1×10^4 L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.5 cm；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；10^9：单位换算系数，1 mol=10^9 nmol。

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

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 g 组织每分钟消耗 1 nmol 2,6-二氯吲哚酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{上清中复合体 II（U/g）} = \frac{\Delta A1 \times V_{反总} \times V_{提} \times 10^9}{\varepsilon \times d \times W \times V_{样} \times T} = \frac{380.95 \times \Delta A1}{W}$$

$$\text{沉淀中复合体 II（U/g）} = \frac{\Delta A2 \times V_{反总} \times V_{样总} \times 10^9}{\varepsilon \times d \times W \times V_{样} \times T} = \frac{153.14 \times \Delta A2}{W}$$

$$\text{复合体 II（U/g）=上清中复合体 II+沉淀中复合体 II=} \frac{380.95 \times \Delta A1}{W} + \frac{153.14 \times \Delta A2}{W}$$

注释：$V_{样}$：反应体系中加入粗酶液的体积，0.01 mL；$V_{反总}$：反应体系总体积，2×10^{-4} 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，0.402 mL；ε：2,6-二氯吲哚酚摩尔消光系数，2.1×10^4 L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.5 cm；T：反应时间，5 min；W：样本含量，g；10^9：单位换算系数，1 mol=10^9 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.
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China
TEL: 400-805-8228
E-MAIL: techsupport@boxbio.cn
Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.