

线粒体呼吸链复合体II活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1395

产品规格：100管/96样

产品简介：

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。

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。

注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体80mL×2瓶	4℃
试剂一	液体40mL×1瓶	4℃
试剂二	粉剂×1支	-20℃
试剂三	粉剂×1支	4℃
试剂四	液体2.5mL×1瓶	4℃

溶液的配制：

1. 试剂二：溶于1mL丙酮，可分装后-20℃保存。临用前再用丙酮100倍稀释后使用。
2. 试剂三：临用前加入2mL丙酮溶解备用。
3. 工作液的配制：临用前将试剂二和试剂三按1：1混合，现用现配。

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、微量玻璃比色皿/96孔板、丙酮、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 称取约0.1g组织或收集500万细胞，加入1.0mL提取液，用匀浆器或研钵于冰上匀浆。
2. 4℃ 600g离心10min。将上清液移至另一离心管中，4℃ 11000g离心15min。
3. 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，可以判断线粒体提取效果）。
4. 在沉淀中加入400μL提取液，超声波破碎（功率20%，超声5秒，间隔10秒，重复15次），用于复合体II酶活性测定，并且用于蛋白含量测定。

二、测定步骤

1. 可见分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至605nm，蒸馏水调零。
2. 将试剂一37℃（哺乳动物）或25℃（其他物种）预热15min。
3. 在微量玻璃比色皿/96孔板中分别加入：

试剂名称(μL)	测定管
样本	10
试剂一	150
工作液	20



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

试剂四	20
将上述试剂分别加入比色皿/96孔板后迅速吹打混匀，记录第10s的吸光值A1，尽量在37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）环境中准确反应2分钟，之后迅速取出记录2min时的吸光度A2，计算 $\Delta A=A1-A2$ 。	

三、复合体II活力单位的计算

1. 按微量玻璃比色皿计算：

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1nmol 2,6-二氯吡啶酚定义为一个酶活力单位。

复合体II活力(U/mg prot)=[$\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 476.2 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

V反总：反应体系总体积， 2×10^{-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，0.01mL；T：反应时间，2min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； 10^9 ：单位换算系数， $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。

2. 以96孔板计算：

将上述公式中的d-1cm改为d-0.6cm进行计算即可。

注意事项：

- 为保证实验结果的准确性，需先取1-2个样做预实验，如果测定的吸光值过高（高于1.5），可用蒸馏水稀释上清液后再测定。计算结果时注意乘以稀释倍数。若 ΔA 大于0.4，需将样本稀释适当倍数（计算公式中乘以相应稀释倍数）；若 ΔA 偏小，则可以通过增加加入的样本体积来提高灵敏度。
- 样本蛋白浓度需自行测定。由于提取液中含有一定浓度的蛋白（约1mg/mL），所以在测定样本蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白含量。
- 推荐使用样本蛋白浓度计算酶活，若用样本质量计算，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。
- 本试剂盒试剂足够完成100管反应。
- 附：使用样本重量计算公式：（样本检测数为100T/48S）

A、上清中复合体II活力的计算：

单位的定义：每g组织在反应体系中每分钟消耗1nmol 2,6-二氯吡啶酚定义为一个酶活力单位。

复合体II活性 (U/g质量)=[$\Delta A1 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 476.2 \times \Delta A1 \div W$

$\Delta A1$ ：上清测定值；V反总：反应体系总体积， 2×10^{-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提取：加入提取液体积，1mL；V样：加入样本体积，0.01mL；T：反应时间，2min；W：样本重量，g； 10^9 ：单位换算系数， $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。

B、沉淀中复合体II活力的计算：

单位的定义：每g组织在反应体系中每分钟消耗1nmol 2,6-二氯吡啶酚定义为一个酶活力单位。

复合体II活性 (U/g质量)=[$\Delta A2 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 190.5 \times \Delta A2 \div W$

$\Delta A2$ ：沉淀测定值；V反总：反应体系总体积， 2×10^{-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提取：沉淀重悬体积，0.4mL；V样：加入样本体积，0.01mL；T：反应时间，2min；W：样本重量，g； 10^9 ：单位换算系数， $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。

C、样本复合体II总活力的计算：

样本复合体II总活力即为上清中复合体II活力与沉淀中复合体II活力之和。

复合体II (U/g质量)= $476.2 \times \Delta A1 \div W + 190.5 \times \Delta A2 \div W$

D、以96孔板计算：

将上述公式中的d-1cm改为d-0.6cm进行计算即可。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com