

# 线粒体复合体 II 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: BC3230

规格: 25T/24S

**产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 45 mL×1 瓶	4°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
试剂三	粉剂×1 支	4°C保存
试剂四	液体 2.5 mL×1 瓶	4°C保存

溶液的配制:

- 1、试剂二: 溶于 1 mL 丙酮, 可分装后-20°C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 2 mL 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。

## 产品说明:

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。**

## 需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器、丙酮、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 °C 600g 离心 10min。将上清液移至另一离心管中, 4 °C 11000 g 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、可见分光光度计预热30min 以上, 调节波长至605nm, 蒸馏水调零。
- 2、将试剂一37°C (哺乳动物) 或25°C (其他物种) 预热15min。

3、在1mL玻璃比色皿中分别加入：

试剂名称	测定管
样本	50
试剂一	750
工作液	100
试剂四	100

将上述试剂分别加入比色皿后迅速吹打混匀，记录第 10s 的吸光值 A1，迅速将比色皿连同反应液一起放入 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）水浴中准确反应 2 分钟，之后迅速取出比色皿并擦干，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

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， $10^{-3}$ L； $\epsilon$ ：2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数， $2.1 \times 10^4$ L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.05mL；T：反应时间，2min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； $10^9$ ：单位换算系数， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

#### 注意事项：

- 1、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 $\Delta A$ 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 $\Delta A$ 偏小，则可以通过增加加入的样本体积来提高灵敏度。
- 2、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。
- 3、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。
- 4、本试剂盒试剂足够完成25管反应。
- 5、附：使用样本重量计算公式：（样本检测数为 25T/12S）

#### 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1 nmol 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， $10^{-3}$ L； $\epsilon$ ：2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数， $2.1 \times 10^4$ 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，0.05mL；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1 nmol 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， $10^{-3}$ L； $\epsilon$ ：2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数， $2.1 \times 10^4$ 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，0.05mL；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) =  $476.2 \times \Delta A1 \div W + 190.5 \times \Delta A2 \div W$

#### 实验实例:

1. 取 0.1g 兔子肝脏样本加入 1mL 提取液进行匀浆研磨离心,按照测定步骤操作,测得上清中  $\Delta A1 = A1 - A2 = 1.134 - 1.054 = 0.08$ , 沉淀中  $\Delta A2 = A1 - A2 = 1.371 - 1.347 = 0.024$ , 则按样本质量计算得:

上清中复合体 II 活性 (U/g 质量) =  $476.2 \times \Delta A1 \div W = 476.2 \times 0.08 \div 0.1 = 380.96$  U/g 质量

沉淀中复合体 II 活性 (U/g 质量) =  $190.5 \times \Delta A2 \div W = 190.5 \times 0.024 \div 0.1 = 45.72$  U/g 质量

复合体 II (U/g 质量) =  $476.2 \times \Delta A1 \div W + 190.5 \times \Delta A2 \div W = 476.2 \times 0.08 \div 0.1 + 190.5 \times 0.024 \div 0.1 = 426.68$  U/g 质量。

#### 相关发表文献:

[1] Qiuli OuYang, Nengguo Tao, Miaoling Zhang. A Damaged Oxidative Phosphorylation Mechanism Is Involved in the Antifungal Activity of Citral against *Penicillium digitatum*. February 2018; (IF4.259)

[2] Wang M, Zhang Y, Xu M, et al. Roles of TRPA1 and TRPV1 in cigarette smoke-induced airway epithelial cell injury model[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2019, 134: 229-238.

[3] Bao Z, Xu X, Chao H, et al. ERK/Nrf2/HO-1 pathway-mediated mitophagy alleviates traumatic brain injury-induced intestinal mucosa damage and epithelial barrier dysfunction[J]. 2017.

#### 参考文献:

[1] Mühlring J, Tiefenbach M, López-Barneo J, et al. Mitochondrial complex II participates in normoxic and hypoxic regulation of  $\alpha$ -keto acids in the murine heart[J]. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2010, 49(6): 950-961.

#### 相关系列产品:

BC0510/BC0515 线粒体呼吸链复合体 I 活性检测试剂盒

BC3240/BC3245 线粒体呼吸链复合体III活性检测试剂盒

BC0940/BC0945 线粒体呼吸链复合体IV活性检测试剂盒

BC1440/BC1445 线粒体呼吸链复合体V活性检测试剂盒