



## 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、50T/48S

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, 有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

| 试剂名称/规格 | 25T           | 50T          | 保存条件    |
|---------|---------------|--------------|---------|
| 提取液一    | 液体 45 mL×1 瓶  | 液体 80 mL×1 瓶 | 2-8°C保存 |
| 提取液二    | 液体 6 mL×1 瓶   | 液体 12 mL×1 瓶 | -20°C保存 |
| 试剂一     | 液体 20 mL×1 瓶  | 液体 40 mL×1 瓶 | 2-8°C保存 |
| 试剂二     | 粉剂×1 支        | 粉剂×1 支       | -20°C保存 |
| 试剂三     | 粉剂×1 支        | 粉剂×2 支       | 2-8°C保存 |
| 试剂四     | 液体 3 mL×1 瓶   | 液体 6 mL×1 瓶  | 2-8°C保存 |
| 试剂五     | 液体 1.5 mL×1 支 | 液体 3 mL×1 瓶  | 2-8°C保存 |

### 25T 溶液的配制:

- 1、试剂二: 临用前加入 0.1mL 丙酮, 丙酮易挥发, 使用完毕后注意封口, -20°C可保存 2 个月;
- 2、试剂二工作液: 临用前根据样本量将试剂二: 丙酮=10 $\mu$ L:1mL (约 20T) 混合备用, 现用现配;
- 3、试剂三: 临用前加入 1mL 丙酮, 充分溶解, 用不完的试剂-20°C分装可保存 4 周, 注意封口;
- 4、工作液的配制: 临用前根据样本量将丙酮: 试剂二工作液: 试剂三=0.25mL: 0.5mL: 0.25mL (1mL, 约 10T) 混合备用, 现用现配。

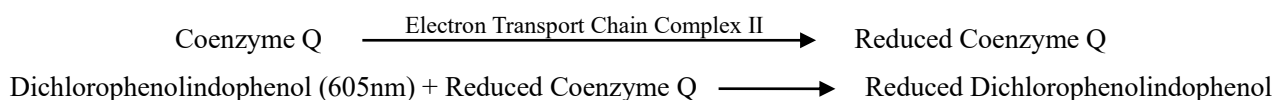
### 50T 溶液的配制:

- 1、试剂二: 临用前加入 0.1mL 丙酮, 丙酮易挥发, 使用完毕后注意封口, -20°C可保存 2 个月;
- 2、试剂二工作液: 临用前根据样本量将试剂二: 丙酮=10 $\mu$ L:1mL (约 20T) 混合备用, 现用现配;
- 3、试剂三: 临用前取 1 支加入 1mL 丙酮, 充分溶解, 用不完的试剂-20°C分装可保存 4 周, 注意封口;
- 4、工作液的配制: 临用前根据样本量将丙酮: 试剂二工作液: 试剂三=0.25mL: 0.5mL: 0.25mL (1mL, 约 10T) 混合备用, 现用现配。

### 产品说明:

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<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/恒温培养箱、可调式移液器、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器、细胞超声破碎仪、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 1.0 mL 提取液一，用匀浆器或研钵于冰上匀浆。
2. 4°C 600 g 离心 10min。将上清液移至另一离心管中，4 °C 11000 g 离心 15min，得到上清液和沉淀。
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 200μL 提取液一和 200μL 提取液二，超声波破碎（功率 200W，超声 5 秒，间隔 10 秒，重复 15 次），用于复合体II活性测定，若用蛋白浓度计算，取 20μL 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预热15min。
- 3、操作表：在1mL玻璃比色皿中分别加入：

| 试剂名称（μL） | 测定管 |
|----------|-----|
| 样本       | 50  |
| 试剂一      | 700 |
| 工作液      | 100 |
| 试剂四      | 100 |
| 试剂五      | 50  |

充分混匀后于605nm处测定10s时的吸光值A1，迅速置于37°C准确反应5分钟，迅速取出测定5min10s时的吸光度A2，计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

#### 三、复合体II活性的计算

##### （1）按样本蛋白浓度计算

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

$$\text{复合体II活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 190.5 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

V反总：反应体系总体积，10<sup>-3</sup>L；ε：2,6-二氯吲哚酚摩尔消光系数，2.1×10<sup>4</sup>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，5min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；10<sup>9</sup>：单位换算系数，1mol=10<sup>9</sup>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，如果测定的吸光值大于1.2，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0.6，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。
- 2、样本蛋白浓度需自行测定。由于提取液一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重悬试剂（提取液一+提取液二）本身的蛋白含量（约0.5mg/mL）。
- 3、推荐使用样本蛋白浓度计算酶活，另附按样本质量计算公式和按细胞数量计算公式
- 4、附：使用样本重量计算公式：（样本检测数为 50T/24S）

#### A、上清中复合体II活性的计算:

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) =  $[\Delta A1 \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V \text{ 提取} \times V \text{ 样}) \div T = 190.5 \times \Delta A1 \div W$

#### B、沉淀中复合体II活性的计算:

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) =  $[\Delta A2 \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V \text{ 重悬} \times V \text{ 样}) \div T = 76.2 \times \Delta A2 \div W$

#### C、样本复合体II总活性的计算:

样本复合体II总活性即为上清中复合体II活性与沉淀中复合体II活性之和。

复合体II总活性 (U/g 质量) =  $190.5 \times \Delta A1 \div W + 76.2 \times \Delta A2 \div W$

$\Delta A1$ : 上清测定值;  $\Delta A2$ : 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: 样本匀浆加入提取液一的体积, 1mL; V 重悬: 沉淀重悬加入提取液一和提取液二的总体积, 0.4mL; V 样: 加入样本体积, 0.05mL; T: 反应时间, 5min; W: 样本重量, g;  $10^9$ : 单位换算系数,  $1mol=10^9nmol$ 。

5、附: 使用细胞数量计算公式: (样本检测数为 50T/24S)

#### A、上清中复合体II活性的计算:

单位的定义: 每  $10^6$  个细胞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/ $10^6$  cell) =  $[\Delta A1 \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \div V \text{ 提取} \times V \text{ 样}) \div T = 190.5 \times \Delta A1 \div N$

#### B、沉淀中复合体II活性的计算:

单位的定义: 每  $10^6$  个细胞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/ $10^6$  cell) =  $[\Delta A2 \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \div V \text{ 重悬} \times V \text{ 样}) \div T = 76.2 \times \Delta A2 \div N$

#### C、样本复合体II总活性的计算:

样本复合体II总活性即为上清中复合体II活性与沉淀中复合体II活性之和。

复合体II总活性 (U/ $10^6$  cell) =  $190.5 \times \Delta A1 \div N + 76.2 \times \Delta A2 \div N$

$\Delta A1$ : 上清测定值;  $\Delta A2$ : 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: 样本匀浆加入提取液一的体积, 1mL; V 重悬: 沉淀重悬加入提取液一和提取液二的总体积, 0.4mL; V 样: 加入样本体积, 0.05mL; T: 反应时间, 5min; N: 细胞数量, 以  $10^6$  计;  $10^9$ : 单位换算系数,  $1mol=10^9nmol$ 。

#### 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] Mühlhling 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/ NADH-CoQ还原酶活性检测试剂盒
- BC3240/BC3245 线粒体呼吸链复合体 III/CoQ-细胞色素 C 还原酶活性检测试剂盒
- BC0940/BC0945 线粒体呼吸链复合体 IV/细胞色素 C 氧化酶活性检测试剂盒
- BC1440/BC1445 线粒体呼吸链复合体 V/ATP 合酶活性检测试剂盒