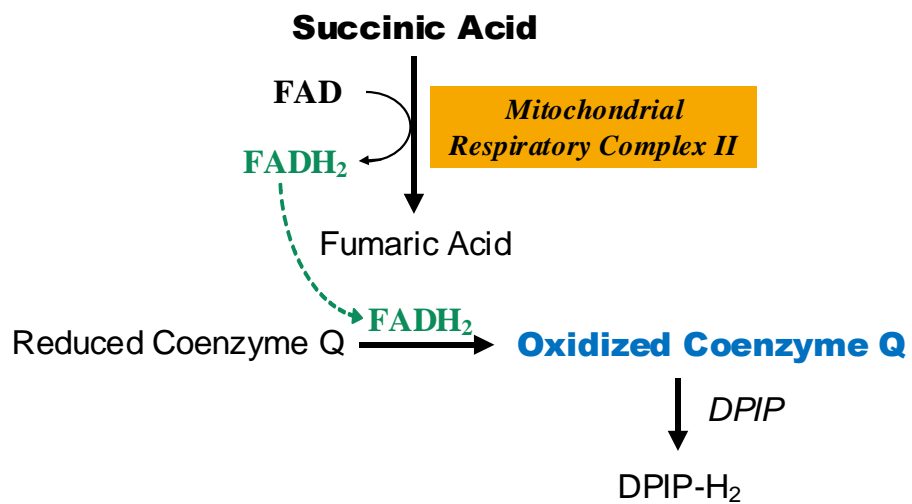




线粒体呼吸链复合体 II 活性检测试剂盒

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>，FADH<sub>2</sub> 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）状态的分析具有重要意义。

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，通过吸光值的变化计算 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°C 保存	-
提取液 B	液体 22 mL×1 瓶	-20°C 保存	-
试剂一	液体 16 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 (密封分装后-20°C可保存 2 个月，避免反复冻融)
试剂二应用液	-	-	使用前按照试剂二：丙酮=1:100 的比例配制 (根据使用量现用现配)
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 (密封分装后-20°C可保存一个月，避免反复冻融)
试剂四	液体 2.5 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂五	液体 1.5 mL×1 支	4°C 保存	-
工作液的配制 (现用现配)：使用前根据使用量按丙酮：试剂二应用液：试剂三=1:2:1 的体积比配制，充分混匀即为工作液。			

需自备试剂：丙酮 (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O, 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/酶标仪、微量玻璃比色皿（光径 10 mm）/96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、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 0.1 g 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°C 600 g 离心 10 min，取上清；将离心上清液移至另一离心管中，4°C 12000 g 离心 15 min；
- ②步骤①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）。
- ③步骤①离心后沉淀中加入 200 μL 提取液 A 和 200 μL 提取液 B，冰浴超声破碎（功率 200 W，超声 5 s，间隔 10 s，重复 15 次）即为待测样本，用于线粒体复合体 II 活性测定。

## 2. 测定步骤

- ①分光光度计或酶标仪预热 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°C 预热 15 min。
- ③在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)
待测样本	10
试剂一	140
工作液	20
试剂四	20
试剂五	10

- 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°C 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

### 3.1 使用 96 孔板测定的计算公式

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。

$$\text{复合体 II (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{380.95 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

### 3.2 使用微量玻璃比色皿测定的计算公式

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。

$$\text{复合体 II (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{190.48 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

注释：V 样：反应体系中加入待测样本的体积，0.01 mL；V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：2,6-二氯吲哚酚摩尔消光系数， $2.1 \times 10^4$  L/mol/cm； $d_1$ ：96 孔板光径，0.5 cm； $d_2$ ：微量玻璃比色皿光径，1 cm；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL； $10^9$ ：单位换算系数，1 mol =  $10^9$  nmol。

#### 四、注意事项

- ①若 A1 大于 1.5 或 ΔA 大于 0.4，将待测样本使用蒸馏水稀释后再进行测定，计算时相应修改；
- ②提取液中含有约 0.5 mg/mL 的蛋白，测定样本蛋白浓度时需减去提取液自身的蛋白含量；
- 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；若使用 96 孔 UV 板测定，应使用多道移液器且分批进行测定，以确保组间反应时间一致；
- 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即为总酶活。

#### 附：使用样本质量计算的公式

##### 3.1 使用 96 孔板测定的计算公式

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。

$$\text{上清中复合体 II (U/g)} = \frac{\Delta A1 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{380.95 \times \Delta A1}{W}$$

$$\text{沉淀中复合体 II (U/g)} = \frac{\Delta A2 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{152.38 \times \Delta A2}{W}$$

$$\text{复合体 II (U/g)} = \text{上清中复合体 II} + \text{沉淀中复合体 II} = \frac{380.95 \times \Delta A1}{W} + \frac{152.38 \times \Delta A2}{W}$$

##### 3.2 使用微量玻璃比色皿测定的计算公式

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。

$$\text{上清中复合体 II (U/g)} = \frac{\Delta A1 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{190.48 \times \Delta A1}{W}$$

$$\text{沉淀中复合体 II (U/g)} = \frac{\Delta A2 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{76.19 \times \Delta A2}{W}$$

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

**注释：** V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； V 样：反应体系中加入待测样本的体积，0.01 mL； V 提：待测样本总体积，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， $2.1 \times 10^4$  L/mol/cm； d<sub>1</sub>：96 孔板光径，0.5 cm； d<sub>2</sub>：微量玻璃比色皿光径，1 cm； T：反应时间，5 min； Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL； 10<sup>9</sup>：单位换算系数，1 mol=10<sup>9</sup> nmol； ΔA1：上清测定值； ΔA2：沉淀测定值。

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

