



线粒体呼吸链复合体II/琥珀酸-辅酶Q还原酶试剂盒

可见分光光度法

货号: R45013-24S/48S

产品简介:

线粒体复合体 II (EC 1.3.5.1) 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, 是控制琥珀酸氧化呼吸链反应的第一步, 也是氧化磷酸化产能过程的关键。

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, 使该物质在 600nm 处的吸光值减小, 通过检测600nm 处的下降速率进而得到复合体 II 酶活性大小。

试剂盒组分与配制:

试剂名称	R45013-24S	保存要求	备注
试剂一	液体30mL×1瓶	4℃保存	
试剂二	液体5mL×1瓶	4℃保存	
试剂三	液体uL×1支	4℃保存	
试剂四	粉剂×1瓶	4℃保存;	临用前甩几下使粉末全部落入底部, 加入2.1mL蒸馏水, 混匀溶解备用。
试剂五	粉剂×1支	4℃保存;	临用前甩几下使粉末全部落入底部, 加入2mL蒸馏水混匀溶解((溶解后的可以-20度分装保存),检测使用前需再用蒸馏水稀释5倍后使用。
试剂六	粉剂×1支	-20℃保存	临用前甩几下使粉末全部落入底部, 加入0.6mL无水乙醇, 完全溶解后再加入0.6mL的蒸馏水, 混匀备用。
试剂七	液体15mL×1瓶	4℃保存	

试剂名称	R45013-48S	保存要求	备注
试剂一	液体60mL×1瓶	4℃保存	
试剂二	液体10mL×1瓶	4℃保存	



试剂三	液体uL×1支	4℃保存	
试剂四	粉剂×1瓶	4℃保存;	临用前甩几下使粉末全部落入底部, 加入4mL蒸馏水, 混匀溶解备用。
试剂五	粉剂×1支	4℃保存;	临用前甩几下使粉末全部落入底部, 加入2mL蒸馏水混匀溶解((溶解后的可以-20度分装保存),检测使用前需再用蒸馏水稀释5倍后使用。
试剂六	粉剂×1支	-20℃保存	临用前甩几下使粉末全部落入底部, 加入1.1mL无水乙醇, 完全溶解后再加入1.1mL的蒸馏水, 混匀备用。
试剂七	液体35mL×1瓶	4℃保存	

所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径1cm)、可调式移液器、低温台式离心机、研钵、无水乙醇、冰和蒸馏水。

线粒体复合体 II 活性测定:

建议正式实验前选取2个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、线粒体制备(提示: 整个线粒体的提取过程须保持4℃低温环境):

①称取约0.1g 组织或收集500万细菌/细胞, 加入1mL 试剂一, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆, 转移至离心管后于4℃×700g 离心10min (若漂浮有脂肪, 可用枪头去除)。

②弃沉淀, 上清液移至另一离心管中, 4℃×12000g 离心10min。沉淀即为提取的线粒体, 用作第④步操作。

③(选做)上步得到的上清液即为胞浆提取物, 可作为样本用于测定从线粒体泄漏的线粒体呼吸链复合体 II, 用于判断线粒体提取效果。

④在沉淀(线粒体)中加入200 μL试剂二和2μL试剂三, 超声波破碎(冰浴, 功率20%或 200W, 超声3s, 间隔10秒, 重复30次), 液体置于冰上用于线粒体复合体I酶活性测定。



【注】:若增加样本量,可按照组织质量(g):提取液体积(mL)为1:5~10的比例进行提取,或按照细菌/细胞数量(10^4):提取液(mL)为500~1000:1的比例进行提取。

2、上机检测:

①可见分光光度计预热30min以上,设定温度25℃,调节波长至600nm,蒸馏水调零。

②若待测上清液比较浑浊(蛋白浓度比较高),可先对样本进行梯度稀释或按照下方加样表梯度减少样本加样量(试剂七相应增加)进行预测定实验。

③将试剂四和五和六和七置于37℃(哺乳动物)或25℃(其它物种)于恒温振荡培养箱或水浴锅中孵育15min;在1mL玻璃比色皿(光径1cm)中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管
试剂四	70
试剂五	50
试剂六	40
试剂七	600
样本	40
混匀,立即于600nm处读取A1,置于37℃(哺乳动物)或25℃(其它物种),10min后读取A2,△A=A1-A2。	

结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义:每毫克组织蛋白每分钟消耗 1nmol 的2,6-二氯吲哚酚定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{复合体活力(nmol/min/mg prot)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 95.2 \times \Delta A \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

2、按样本鲜重计算:

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

$$\text{复合体活力(nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T$$



$$=19.2 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 每1万个细菌/细胞每分钟消耗1nmol 的2,6-二氯吡啶酚定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{复合体活力}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] = (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 0.038 \times \Delta A \end{aligned}$$

ϵ ---2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数, $2.1 \times 10^4 \text{L}/\text{mol}/\text{cm}$;

d ---96 孔板光径, 1cm;

V ---加入提取液体积, 0.202mL;

$V1$ ---加入样本体积, 0.04mL;

$V2$ --- 反应体系总体积, $8 \times 10^{-4} \text{L}$;

T -- 反应时间, 10min;

W ---样本质量, g;

500--细胞或细菌总数, 500万;

Cpr ---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的BCA蛋白含量检测试剂盒。