北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www.bjoka-vip.com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

线粒体复合体II试剂盒说明书

分光法 24 样

一、产品说明

线粒体复合体 II 又称琥珀酸-辅酶 Q 还原酶，是线粒体呼吸作用中非常重要的酶，由几个多肽组成，包括催化三羧酸循环关键反应的含 FAD 的琥珀酸脱氢酶和几个 Fe-S 中心。复合体 II 把电子从琥珀酸经 Fe-S 传递给泛醌，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。

二、自备仪器和用品

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、冰和蒸馏水。

三、试剂的组成和配制

试剂名称	规格	保存温度	配置	备注
试剂一	液体 25mL×1 瓶	-20℃保存		
试剂二	液体 5mL×1 瓶	-20℃保存		
试剂三	液体 0.5mL×1 支	-20℃保存		
试剂四	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	工作液配置：临用前把试剂五和试剂六转移到试剂四中混合溶解	用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融
试剂五	粉剂×1 支	-20℃保存		
试剂六	粉剂×1 支	-20℃保存		
试剂七	液体 2.5mL×1 瓶	4℃保存		

四、样品的前处理

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

（1）组织样本胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离：

1、 准确称取 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。

2、 将匀浆 600g，4℃离心 5min。

3、 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃离心 10min。

4、 上清液即为除去线粒体的胞浆蛋白，可用于测定从线粒体泄漏的复合体 II（此步可选做）。

5、 步骤④中的沉淀即为线粒体，加入 200μL 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），用于复合体 II 酶活性测定。

（2）细菌/细胞样本

收集细胞或细菌到离心管内，弃上清取 500 万细菌或细胞加入 200μL 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），用于复合体 II 酶活性测定

五、测定步骤

1、分光光度计预热，调节波长至 605nm；

2、临用前将工作液置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）孵育 5min。

3、在 1mL 玻璃比色皿中依次加入下列试剂

试剂（μL）	测定管
上清液	40
试剂七	100
工作液	800
立即混匀，记录 605nm 处初始吸光值 A1 和 2min 后的吸光值 A2，计算ΔA=A1-A2。	

六、计算公式

（1） 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 1 nmol 2,6-二氯吲哚酚定义为一个酶活力单位。

复合体Ⅱ活力(nmol/min/mg prot)=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(V 样×Cpr) ÷T=559×ΔA÷Cpr

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

（2） 按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织每分钟消耗 1 nmol 2,6-二氯吲哚酚定义为一个酶活力单位。

复合体Ⅱ活力(nmol/min/g 鲜重)=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(W× V 样÷V 样总) ÷T=113×ΔA÷W

（3） 按细菌或细胞密度计算

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol 2,6-二氯吲哚酚定义为一个酶活力单位。

复合体Ⅱ活力(nmol/min/10^4 cell)=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(500×V 样÷V 样总) ÷T =0.226×ΔA

V 反总：反应体系总体积，9.4×10^{-4} L；ε：2,6-二氯吲哚酚摩尔消光系数，2.1×10^4 L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.04 mL；V 样总：加入提取液体积，0.202 mL；T：反应时间，2 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万。

