

线粒体复合体 II 试剂盒说明书

分光光度法 25 管/24 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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 FADH₂，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。

测定原理：

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。

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、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

- 试剂一：25mL×1 瓶，-20℃保存；
- 试剂二：5mL×1 瓶，-20℃保存；
- 试剂三：0.5 mL×1 支，-20℃保存；
- 试剂四：液体 25mL×1 瓶，4℃保存；
- 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；

样本的前处理：

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离：

- 1、准确称取 0.1g 组织或收集 500 万细菌或细胞，加入 1mL 试剂一和 10uL 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 200uL 试剂二和 2uL 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。

测定步骤：

- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 605nm，蒸馏水调零。
- 2、样本测定
 - （1）工作液的配制：临用前把试剂五和试剂六转移到试剂四中混合溶解，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃

(其它物种) 孵育 5min; 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。

(2) 在 1mL 玻璃比色皿中加入 40 μL 样本、100 μL 试剂七和 800 μL 工作液, 立即混匀, 记录 605nm 处初始吸光值 A1 和 2min 后的吸光值 A2, 计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

复合体 II 活力单位的计算:

(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 2,6-二氯吡啶酚定义为一个酶活力单位。

复合体 II 活力(nmol/min/mg prot)=[$\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T=559 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

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 2,6-二氯吡啶酚定义为一个酶活力单位。

复合体 II 活力(nmol/min/g 鲜重)=[$\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T=113 \times \Delta A \div W$

(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 2,6-二氯吡啶酚定义为一个酶活力单位。

复合体 II 活力(nmol/min/ 10^4 cell)=[$\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T=0.226 \times \Delta A$

V 反总: 反应体系总体积, 9.4×10^{-4} L; ϵ : 2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数, 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。