

线粒体呼吸链复合体 II 检测试剂盒（分光光度法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

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：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°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）孵育 5min；用不完的试剂分装后-20°C 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。

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

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。

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

- (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。

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

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。