



# 线粒体呼吸链复合物 II 活性比色法定量检测试剂盒产品说明书

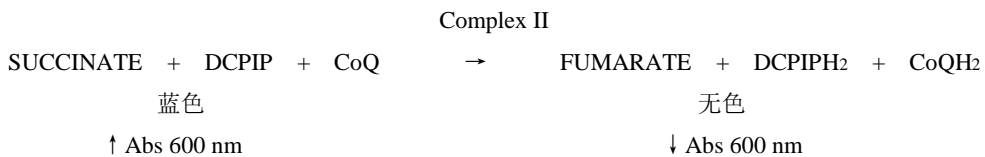
## (A089-2-1 21 管/20 样)

### 一、主要用途

线粒体呼吸链复合物 II（琥珀酸—辅酶 Q 还原酶）活性比色法定量检测试剂是一种旨在使用合成辅酶 Q 同功类似物二氯酚靛酚，通过反应系统测定样品中二氯酚靛酚还原后吸光峰值的变化，即采用比色法测定样品中酶活性的权威而经典的技术方法。该技术经过精心研制、成功实验证明的。其适合于其适合于各种纯化线粒体样品（动物、人体、酵母）以及细胞或组织裂解悬液样品的琥珀酸—辅酶 Q 还原酶的特异性活性检测。可用于衰老、能量代谢、蛋白组学、病理生理学、神经病变等研究。产品不含污染性蛋白酶，严格无菌，即到即用，操作简捷，性能稳定，反应优化，检测敏感。

### 二、技术背景

线粒体呼吸链复合物II，通常称为琥珀酸—辅酶Q还原酶或琥珀酸脱氢酶（Succinate-Coenzyme Q Reductase; Succinate Dehydrogenase），是线粒体电子传递链与三羧酸循环链接的载体：含有四个亚单位，包括共价结合的辅基黄素腺嘌呤二核苷酸（flavin adenine dinucleotide; FAD）和三个铁硫中心（Fe-S clusters），以及细胞色素b亚单位，其最特征性的酶活性是丙二酸钠敏感的琥珀酸—辅酶Q还原酶。复合物II催化琥珀酸（succinate）被氧化为富马酸（fumarate），线粒体内电子由供体FAD传递到内膜上辅酶Q受体（泛醌；ubiquinone）的能量转移反应，进行呼吸链传递。该酶异常会导致嗜铬细胞瘤（paraganglioma）、肾上腺嗜铬细胞瘤（pheochromocytoma）和Leigh综合征。基于琥珀酸底物，通过琥珀酸—辅酶Q还原酶的催化，氧化为富马酸，同时氧化型二氯酚靛酚（dichlorophenol-indophenol; DCPIP）转化为还原型二氯酚靛酚（dichlorophenol-indophenol; DCPIPH<sub>2</sub>），在分光光度计下产生吸光峰值的变化（600nm 波长），由此定量测定琥珀酸—辅酶Q还原酶的特异活性。其反应系统是：



### 三、产品内容

缓冲液（Reagent A）	20 毫升
反应液（Reagent B）	2.5 毫升
阴性液（Reagent C）	2 毫升
底物液（Reagent D）	500 微升
产品说明书	1 份



#### 四、保存方式

-20℃冰箱保存，避免反复冻融；反应液（Reagent B）和底物液（Reagent D），避免光照，有效期6月。

#### 五、用户自备

比色皿：用于比色分析的容器

分光光度仪：用于比色分析

培养箱：用于孵育反应物

#### 六、实验步骤

实验开始前，将-20℃冰箱里的试剂盒中的试剂溶液置入冰槽里融化；缓冲液（Reagent A）室温预热；反应液（Reagent B）和底物液（Reagent D）注意避光。然后进行下列操作。

##### （一）、测定准备

- 1、准备好待测样品（例如纯化线粒体样品等），置于冰槽里
- 2、设定好分光光度仪（温度为30℃）：波长为600nm，间隔60秒，读数6次（共5分钟），并置零

##### （二）、背景对照测定

- 1、移取780微升缓冲液（Reagent A）到新的比色皿
- 2、加入100微升反应液（Reagent B）
- 3、加入20微升底物液（Reagent D）
- 4、上下颠倒数次，混匀
- 5、放进30℃培养箱里静置3分钟
- 6、加入100微升阴性液（Reagent C）
- 7、上下颠倒数次，混匀（限定在3秒之内）
- 8、即刻放进分光光度仪检测，此为背景空对照：  
**600 波长读数 0 分钟—600 波长读数 1 分钟或 5 分钟**

##### （三）、样品活性测定

- 1、移取780微升缓冲液（Reagent A）到新的比色皿
- 2、加入100微升反应液（Reagent B）
- 3、加入20微升底物液（Reagent D）
- 4、上下颠倒数次，混匀
- 5、放进30℃培养箱里静置3分钟
- 6、加入100微升待测样品（注意：**10 微克总线粒体蛋白**）
- 7、上下颠倒数次，混匀（限定在3秒之内）
- 8、即刻放进分光光度仪检测，此为样品总活性读数：  
**600 波长读数 0 分钟—600 波长读数 1 分钟或 5 分钟**



#### （四）、计算样品活性

$$\frac{(\text{样本读数} - \text{背景读数}) \times \text{体系容量} (1\text{ml}) \times \text{样本稀释倍数}}{\text{样本容量} (0.1\text{ml}) \times 21.8 (\text{毫摩尔吸光系数}) \times \text{反应时间} (1 \text{或者} 5 \text{分钟})} \cdot \text{样本蛋白浓度} (\text{mgprot/ml})$$

单位：  $\mu\text{mol DCPIP} / \text{min/mgprot}$

#### 七、注意事项

- 1、本产品为 21 次（20 个样本）操作，包括背景对照测定
- 2、操作时，须戴手套
- 3、系统操作过程中，背景测定只需 1 次
- 4、**反应液（Reagent B）** 含有毒性物质，避免直接用手接触
- 5、线粒体样品检测前，须溶解；建议冻存融解（ $-70^{\circ}\text{C}$  至  $37^{\circ}\text{C}$ ）循环 3 次
- 6、如果增强酶活检测，建议使用线粒体复合物待测样品预处理试剂盒
- 7、加入样品启动反应后 3 秒内即刻比色测定
- 8、通常比色测定的 OD340 起始读数 0.5 为理想状态
- 9、通常反应 1 分钟后比色测定值趋于稳定；测定值由高到低变化；测定可以持续 5 分钟
- 10、测定值由高到低变化，即 3 分钟测定读数低于 0 分钟测定读数，表明有酶活性
- 11、比色测定后，比色皿须清洗彻底
- 12、建议待测样本线粒体蛋白浓度为 10 微克/100 微升；如果样本酶活性过低或过高，则可以增加或降低样本量；注意计算公式的调整（本公司提供线粒体溶解试剂盒为后续线粒体蛋白浓度测定的预处理试剂盒和 Bradford 蛋白质浓度定量试剂盒）
- 13、如果使用细胞或组织裂解悬液，则蛋白浓度为 50 微克/100 微升
- 14、线粒体呼吸链复合物 II（琥珀酸—辅酶 Q 还原酶）单位活性定义为：在  $30^{\circ}\text{C}$ ，pH 7.5 条件下，每分钟内能够还原 1 微摩尔合成辅酶 Q 同功类似物二氯酚靛酚（DCPIP）所需的酶量作为一个活性单位
- 15、本公司提供系列线粒体及其酶类技术产品

#### 八、质量标准

本产品经鉴定性能稳定

本产品经鉴定检测准确