

## 线粒体呼吸链复合体II/琥珀酸-辅酶 Q 还原酶活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

**注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。**

货号：BC3230

规格：25T/24S、50T/48S

**产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。**

试剂名称	25T 规格	50T 规格	保存条件
提取液一	液体 45 mL×1 瓶	液体 80 mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液二	液体 6 mL×1 瓶	液体 12 mL×1 瓶	-20℃保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	液体 40 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	粉剂×1 支	粉剂×2 支	2-8℃保存
试剂四	液体 3 mL×1 瓶	液体 6 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	液体 1.5 mL×1 支	液体 3 mL×1 瓶	2-8℃保存

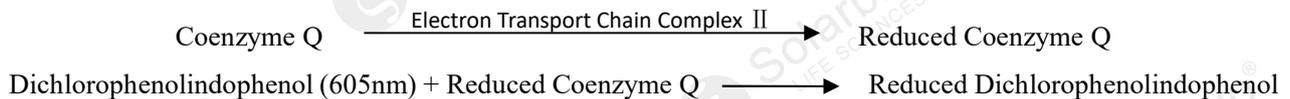
溶液的配制：

- 1、试剂一：若试剂有析出，取上清溶液使用即可；
- 2、试剂二：临用前加入 0.1mL 丙酮，丙酮易挥发，使用完毕后注意封口，-20℃可保存 2 个月；
- 3、试剂二工作液：临用前根据样本量将试剂二：丙酮=10μL:1mL（约 20T）混合备用，现用现配；
- 4、试剂三：临用前加入 1mL 丙酮，充分溶解，用不完的试剂-20℃分装可保存 4 周，注意封口；
- 5、工作液的配制：临用前根据样本量将丙酮：试剂二工作液：试剂三=0.25mL：0.5mL：0.25mL（1mL，约 10T）混合备用，现用现配。

### 产品说明：

线粒体呼吸链复合体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FADH<sub>2</sub>，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。

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。



**注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。**

### 需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、1mL玻璃比色皿、研钵/匀浆器、细胞超声破碎仪、丙酮（>98%，AR）、冰和蒸馏水。

### 操作步骤：





## 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞，加入 1.0 mL 提取液一，用匀浆器或研钵于冰上匀浆。
2. 4°C 600 g 离心 10min。将上清液移至另一离心管中，4 °C 11000 g 离心 15min，得到上清液和沉淀。
3. 上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的复合体II（此步可选做，可以判断线粒体提取效果）。
4. 在沉淀中加入 200μL 提取液一和 200μL 提取液二，超声波破碎（功率 200W，超声 5 秒，间隔 10 秒，重复 15 次），用于复合体II活性测定，若用蛋白浓度计算，取 20μL 用于蛋白含量测定。

## 二、测定步骤

- 1、可见分光光度计预热30min以上，调节波长至605nm，蒸馏水调零。
- 2、将试剂一37°C预热15min。
- 3、操作表：在1mL玻璃比色皿中分别加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	50
试剂一	700
工作液	100
试剂四	100
试剂五	50

充分混匀后于605nm处测定10s时的吸光值A1，迅速置于37°C准确反应5分钟，迅速取出测定5min10s时的吸光度A2，计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

## 三、复合体II活性的计算

### (1) 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟消耗 1nmol 2,6-二氯吡啶酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体II活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 190.5 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

V反总：反应体系总体积，10<sup>-3</sup>L；ε：2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数，2.1×10<sup>4</sup>L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.05mL；T：反应时间，5min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；10<sup>9</sup>：单位换算系数，1mol=10<sup>9</sup>nmol。

### 注意事项：

- 1、为保证实验结果的准确性，需先取1-2个样做预实验，如果测定的吸光值大于1.2，可用蒸馏水稀释上清液后再测定。计算结果时注意乘以稀释倍数。若 $\Delta A$ 大于0.6，需将样本稀释适当倍数（计算公式中乘以相应稀释倍数）；若 $\Delta A$ 偏小，则可以通过增加加入的样本体积来提高灵敏度。
- 2、样本蛋白浓度需自行测定。由于提取液一中含有一定浓度的蛋白（约1mg/mL），所以在测定样本蛋白浓度时需要减去重悬试剂（提取液一+提取液二）本身的蛋白含量（约0.5mg/mL）。
- 3、推荐使用样本蛋白浓度计算酶活，另附按样本质量计算公式和按细胞数量计算公式
- 4、附：使用样本重量计算公式：（样本检测数为 25T/12S）

### A、上清中复合体II活性的计算：

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟消耗 1nmol 2,6-二氯吡啶酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体II活性 (U/g 质量)} = [\Delta A1 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 190.5 \times \Delta A1 \div W$$

### B、沉淀中复合体II活性的计算：

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟消耗 1nmol 2,6-二氯吡啶酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体II活性 (U/g 质量)} = [\Delta A2 \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V_{\text{重悬}} \times V_{\text{样}}) \div T = 76.2 \times \Delta A2 \div W$$



**C、样本复合体II总活性的计算:**

样本复合体II总活性即为上清中复合体II活性与沉淀中复合体II活性之和。

$$\text{复合体II总活性 (U/g 质量)} = 190.5 \times \Delta A1 \div W + 76.2 \times \Delta A2 \div W$$

$\Delta A1$ : 上清测定值;  $\Delta A2$ : 沉淀测定值; V 反总: 反应体系总体积,  $10^{-3}$ L;  $\epsilon$ : 2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数,  $2.1 \times 10^4$  L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 提取: 样本匀浆加入提取液一的体积, 1mL; V 重悬: 沉淀重悬加入提取液一和提取液二的总体积, 0.4mL; V 样: 加入样本体积, 0.05mL; T: 反应时间, 5min; W: 样本重量, g;  $10^9$ : 单位换算系数,  $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

5、附: 使用细胞数量计算公式: (样本检测数为 25T/12S)

**A、上清中复合体II活性的计算:**

单位的定义: 每  $10^6$  个细胞在反应体系中每分钟消耗 1nmol 2,6-二氯吡啶酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体II活性 (U/10}^6 \text{ cell)} = [\Delta A1 \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \div V \text{ 提取} \times V \text{ 样}) \div T = 190.5 \times \Delta A1 \div N$$

**B、沉淀中复合体II活性的计算:**

单位的定义: 每  $10^6$  个细胞在反应体系中每分钟消耗 1nmol 2,6-二氯吡啶酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{复合体II活性 (U/10}^6 \text{ cell)} = [\Delta A2 \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \div V \text{ 重悬} \times V \text{ 样}) \div T = 76.2 \times \Delta A2 \div N$$

**C、样本复合体II总活性的计算:**

样本复合体II总活性即为上清中复合体II活性与沉淀中复合体II活性之和。

$$\text{复合体II总活性 (U/10}^6 \text{ cell)} = 190.5 \times \Delta A1 \div N + 76.2 \times \Delta A2 \div N$$

$\Delta A1$ : 上清测定值;  $\Delta A2$ : 沉淀测定值; V 反总: 反应体系总体积,  $10^{-3}$ L;  $\epsilon$ : 2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数,  $2.1 \times 10^4$  L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 提取: 样本匀浆加入提取液一的体积, 1mL; V 重悬: 沉淀重悬加入提取液一和提取液二的总体积, 0.4mL; V 样: 加入样本体积, 0.05mL; T: 反应时间, 5min; N: 细胞数量, 以  $10^6$  计;  $10^9$ : 单位换算系数,  $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

**相关发表文献:**

[1] Zhou N, Qi H, Liu J, Zhang G, Liu J, Liu N, Zhu M, Zhao X, Song C, Zhou Z, Gong J, Li R, Bai X, Jin Y, Song Y, Yin Y. Deubiquitinase OTUD3 regulates metabolism homeostasis in response to nutritional stresses. Cell Metab. 2022 Jul 5;34(7):1023-1041.e8. doi: 10.1016/j.cmet.2022.05.005. Epub 2022 Jun 7. PMID: 35675826.

[2] Li C, Wu B, Li Y, Chen J, Ye Z, Tian X, Wang J, Xu X, Pan S, Zheng Y, Cai X, Jiang L, Zhao M. Amino acid catabolism regulates hematopoietic stem cell proteostasis via a GCN2-eIF2 伪 axis. Cell Stem Cell. 2022 Jul 7;29(7):1119-1134.e7. doi: 10.1016/j.stem.2022.06.004. PMID: 35803229.

[3] Lu X, Xuan W, Li J, Yao H, Huang C, Li J. AMPK protects against alcohol-induced liver injury through UQCRC2 to up-regulate mitophagy. Autophagy. 2021 Nov;17(11):3622-3643. doi: 10.1080/15548627.2021.1886829. Epub 2021 Mar 14. PMID: 33719895; PMCID: PMC8632272.

[4] Xu Y, Chen B, Yi J, Tian F, Liu Y, Ouyang Y, Yuan C, Liu B. Buyang Huanwu Decoction alleviates cerebral ischemic injury through modulating caveolin-1-mediated mitochondrial quality control. Front Pharmacol. 2023 May 10;14:1137609. doi: 10.3389/fphar.2023.1137609. PMID: 37234709; PMCID: PMC10206009.

[5] Huang SJ, Chen SQ, Lin Y, Yang HY, Ran J, Yan FF, Huang M, Liu XL, Hong LC, Zhang XD, Lyu GR, Wang ZX, Su YM. Maternal nicotine exposure aggravates metabolic associated fatty liver disease via PI3K/Akt signaling in adult offspring mice. Liver Int. 2021 Aug;41(8):1867-1878. doi: 10.1111/liv.14902. Epub 2021 May 11. PMID: 33894105.





### 参考文献:

[1] Mühlhling J, Tiefenbach M, López-Barneo J, et al. Mitochondrial complex II participates in normoxic and hypoxic regulation of  $\alpha$ -keto acids in the murine heart[J]. Journal of molecular and cellular cardiology, 2010, 49(6): 950-961.

### 相关系列产品:

- BC0510/BC0515 线粒体呼吸链复合体I/ NADH-CoQ还原酶活性检测试剂盒
- BC3240/BC3245 线粒体呼吸链复合体 III/CoQ-细胞色素 C 还原酶活性检测试剂盒
- BC0940/BC0945 线粒体呼吸链复合体 IV/细胞色素 C 氧化酶活性检测试剂盒
- BC1440/BC1445 线粒体呼吸链复合体 V/ATP 合酶活性检测试剂盒

