（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K835-M

产品规格：48T(46 samples)/ 96T(94 samples)

检测仪器：酶标仪(590-610 nm)

Elabscience®细胞线粒体呼吸链复合物 II 比色法测试盒

Cell Mitochondrial Complex II Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100
邮箱：biochemical@elabscience.cn
网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测细胞样本中线粒体呼吸链复合物 II 的活力。

检测原理

线粒体呼吸链复合物Ⅱ又称琥珀酸-辅酶 Q 还原酶，广泛存在于动物、植物、微生物和细胞的线粒体中，它催化三羧酸循环中的琥珀酸氧化成延胡索酸(富马酸)，通过复合物中的基本单元结构比如硫铁蛋白等，使泛醌转化为还原形态。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 600 nm 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。

本试剂盒检测细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extraction Solution)	25 mL×1 瓶	50 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	抑制剂 (Inhibitor)	0.8 mL×1 支	0.8 mL×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	缓冲液 (Buffer Solution)	10 mL×1 瓶	20 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 A (Substrate A)	0.8 mL×1 支	1.6 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	底物 B (Substrate B)	1.5 mL×1 支	1.5 mL×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	底物 C (Substrate C)	0.6 mL×1 支	1.2 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(590-610 nm，最佳检测波长 600 nm)

试剂：生理盐水(0.9% NaCl)或 PBS(0.01 mol/L，pH = 7.4)

试剂准备

① 检测前，所有的试剂平衡至室温。

② 反应工作液的配制：

按试剂三：试剂四：试剂五：试剂六=15: 1: 2: 1的体积比混匀，按需配制，避光保存，当天使用完毕。

样本准备

样本处理

细胞样本：收集1×10^6细胞样本加入0.2 mL试剂一和4 μL试剂二，振荡混匀，超声破碎(冰浴，功率200 W，超声5 s，间隔10 s，重复15次)，10000 × g低温离心3 min，弃沉淀取上清置于冰盒上待测，留取部分上清用于蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.54-17.66 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
1×10^6 HL-60 细胞	不稀释	1×10^6 Hela 细胞	不稀释
4×10^6 CHO 细胞	不稀释	1×10^6 Jurkat 细胞	不稀释
1×10^6 K562 细胞	不稀释	1×10^6 293T 细胞	不稀释

注：样本稀释液为试剂一。

实验关键点

① 加入反应工作液时需缓慢加入，避免产生气泡。

② 尽量使用新鲜样本进行测定，样本处理后需当天进行测定。

③ 每次实验样本数控制在 10 个以内。

操作步骤

① 空白孔：向空白孔中加入 20 μL 试剂一。

测定孔：测定孔加入 20 μL 待测样本。

② 向步骤①中的各孔中加入 150 μL 反应工作液。

③ 振板 3 s，酶标仪于 600 nm 波长，测定各孔 OD 值 A_1，37°C 孵育 5 min，测定 OD 值 A_2，$\Delta A=A_1-A_2$。

操作表

	空白孔	测定孔
待测样本(μL)	--	20
试剂一(μL)	20	--
反应工作液(μL)	150	150
振板 3 s，酶标仪于 600 nm 波长，测定各孔 OD 值 A_1，37°C 孵育 5 min，测定 OD 值 A_2， $\Delta A = A_1 - A_2$。		

本试剂盒检测细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

细胞中线粒体呼吸链复合物 II 酶活力计算公式：

定义：室温条件下，每克细胞蛋白每分钟水解底物生成 1 μmol 产物所需要的复合物 II 酶量为一个酶活力单位。

$$\text{复合物 II 活力 (U/gprot)} = \frac{(\Delta A_{测} - \Delta A_{空}) \times V_{总} \times f}{V_{样} \times 21.8^{*} \times T \times C_{pr}} \times 1000^{*}$$

注解：

$\Delta A_{测}$：测定孔变化 OD 值($A_1 - A_2$)

$\Delta A_{空}$：空白孔变化 OD 值($A_1 - A_2$)

f：样本加入检测体系之前的稀释倍数

$V_{总}$：反应体系的总体积，0.17 mL

$V_{样}$：加入样本的体积，0.02 mL

21.8*：摩尔吸光系数

C_{pr}：样本蛋白浓度，gprot/L

T：反应时间 5 min

1000*：1 mmol = 1000 μmol

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	0.54-17.66 U/L	**批间差**	3.0-6.0 %
灵敏度	0.54 U/L	**批内差**	2.0-5.0 %
回收率	97-105 %		

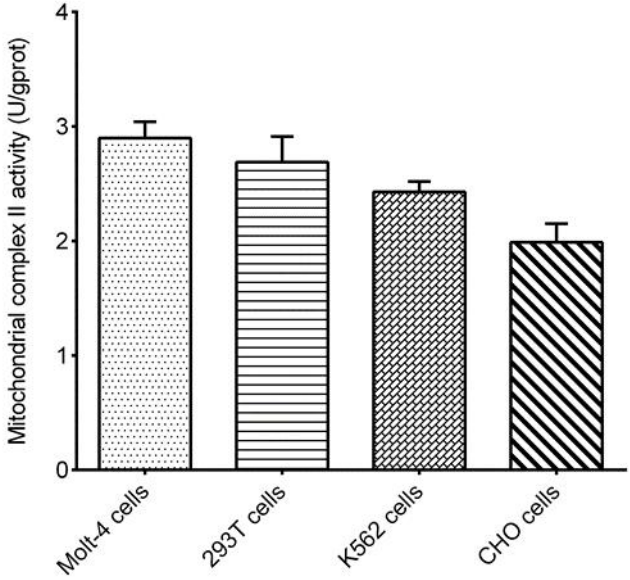
附录 2 实例分析

例如检测Molt-4细胞样本(数据仅供参考)：

取20 μL Molt-4细胞样本，按操作表操作，结果如下：空白孔初始OD值A_1为0.760，5 min时的OD值A_2为0.756；测定孔初始OD值A_1为0.794，5 min时的OD值A_2为0.767，Molt-4细胞样本的蛋白浓度为0.627 gprot/L，计算结果为：

$$\text{线粒体复合物 II 活力 (U/gprot)} = \frac{(0.794 - 0.767) - (0760 - 0.756) \times 0.17}{0.02 \times 21.8 \times 5 \times 0.627} \times 1000 = 2.861\ \text{U/gprot}$$

按照操作过程，测定Molt-4细胞样本(1×10^6个，蛋白浓度为0.627 gprot/L，加样量20 μL)、293T细胞样本(1×10^6个，蛋白浓度为1.044 gprot/L，加样量20 μL)、K562细胞样本(1×10^6个，蛋白浓度为1.300 gprot/L，加样量20 μL)及CHO细胞(4×10^6个，蛋白浓度为5.510 grot/L，加样量20 μL)中的复合物II活力(如下图)：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
复孔差异大	测定 OD 值时，酶标板孔中有气泡	缓慢小心加样或用移液枪将气泡消去
样本测不出值	样本中酶活较低，样本保存时间过长或者保存不当	增加样本的浓度
		取新鲜样本，重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。