

(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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 避光 保存 6 个月 |
| | 96 孔酶标板 | 1 板 | | |
| | 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 μ L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), $10000 \times g$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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。

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

注解：

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

$\Delta A_{\text{空}}$ ：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

$V_{\text{总}}$ ：反应体系的总体积，0.17 mL

$V_{\text{样}}$ ：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 % | | |

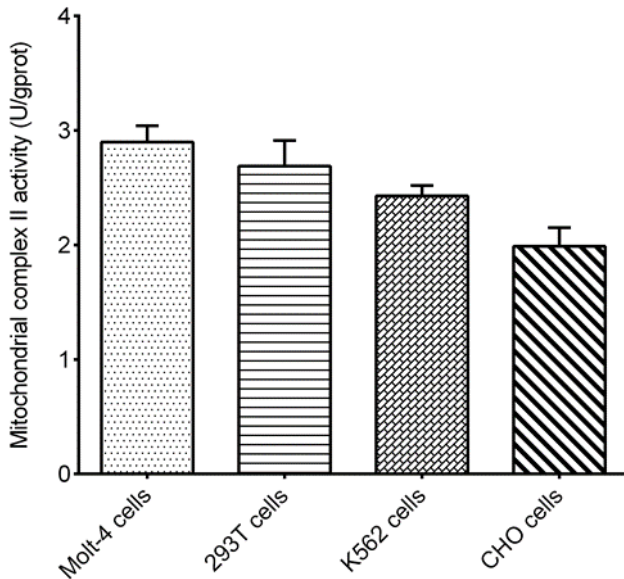
附录 2 实例分析

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:

$$\text{线粒体复合物 II 活力 (U/gprot)} = \frac{(0.794 - 0.767) - (0.760 - 0.756) \times 0.17}{0.02 \times 21.8 \times 5 \times 0.627} \times 1000 = 2.861 \text{ U/gprot}$$

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 gprot/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。