

(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-K150-M

产品规格: 48T(46 samples)/ 96T(94 samples)

检测仪器: 酶标仪(590-610 nm)

Elabscience®线粒体呼吸链复合物 II 比色法测试盒

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动物组织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、微生物和培养细胞的线粒体中, 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 2,6-二氯吡啶酚, 2,6-二氯吡啶酚在 600 nm 有特征吸收峰, 通过检测 2,6-二氯吡啶酚的减少速率来计算该酶活性。

本试剂盒检测组织样本时, 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 A (Extraction Solution A)	50 mL×1 瓶	50 mL×2 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	提取液 B (Extraction Solution B)	15 mL×1 瓶	30 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	抑制剂 (Inhibitor)	0.8 mL×1 支	0.8 mL×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	缓冲液 (Buffer Solution)	10 mL×1 瓶	20 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	底物 A (Substrate A)	0.8 mL×1 支	1.6 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	底物 B (Substrate B)	1.5 mL×1 支	1.5 mL×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	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 M，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：

按试剂四：试剂五：试剂六：试剂七=15: 1: 2: 1的体积比混匀，37℃孵育 10 min，按需配制，避光保存，当天使用完毕。

样本准备

样本处理

组织样本：取0.1 g 组织样本加入0.9 mL试剂一匀浆， $600 \times g$ 4℃离心5 min，弃沉淀取上清。上清液 $15000 \times g$ 低温离心10 min，弃上清取沉淀。沉淀加入200 μ L试剂二与10 μ L试剂三混匀，超声1 min。 $15000 \times g$ 低温离心10 min，弃沉淀取上清待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

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
10%大鼠肝组织	不稀释	10%小鼠肝组织	不稀释
10%大鼠心组织	不稀释	10%小鼠肾组织	不稀释
10%大鼠肾组织	不稀释	10%小鼠心组织	不稀释

注：样本稀释液为试剂二。

实验关键点

- ① 加入工作液时需触壁缓慢加入，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 空白孔和测定孔：取 190 μL 反应工作液加入到各个酶标孔
- ② 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 min。
- ③ 向步骤②中的空白孔加入 20 μL 试剂二。
向步骤②中的测定孔加入 20 μL 样本。
- ④ 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 3 min, 测定 OD 值 A_2 , $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

操作表

	空白孔	测定孔
反应工作液(μL)	190	190
37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 min		
待测样本(μL)	--	20
试剂二(μL)	20	--
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 3 min, 测定 OD 值 A_2 , $\Delta A = A_1 - A_2$ 。		

本试剂盒检测组织样本时, 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

组织中线粒体呼吸链复合物 II 酶活力计算公式(以蛋白浓度计算):

定义: 室温条件下, 每克组织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。

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

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, mL

$V_{\text{样}}$: 加入样本的体积, mL

21.8*: 摩尔吸光系数

C_{pr} : 样本蛋白浓度 gprot/L

T: 反应时间 3 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	平均批间差	5 %
灵敏度	0.54 U/L	平均批内差	4 %
平均回收率	97 %		

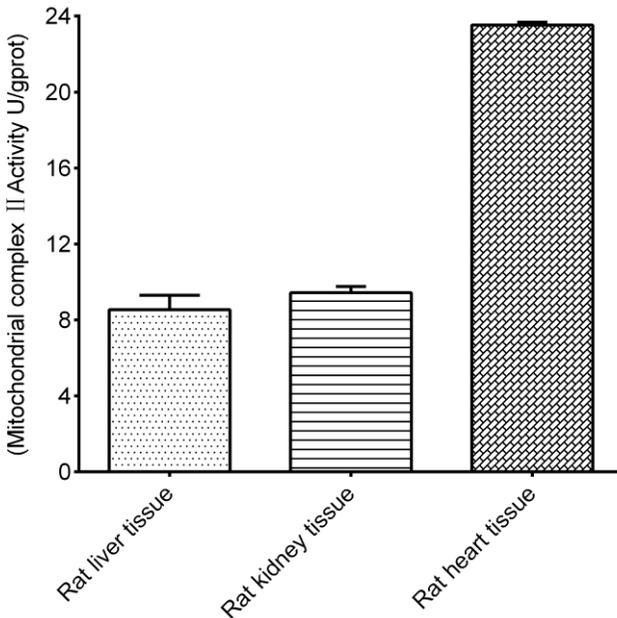
附录 2 实例分析

例如检测大鼠心组织样本(数据仅供参考):

取20 μL 10%的大鼠心组织匀浆, 按操作表操作, 结果如下: 空白孔初始OD值 A_1 为0.979, 3 min时的OD值 A_2 为0.972; 测定孔初始OD值 A_1 为0.671, 3 min时的OD值 A_2 为0.310, 10%大鼠心组织样本的蛋白浓度为2.07 gprot/L, 计算结果为:

$$\text{复合物 II 活力 (U/gprot)} = \frac{(0.671 - 0.310) - (0.979 - 0.972) \times 0.21}{0.02 \times 21.8 \times 3 \times 2.07} \times 1000 = 27.61 \text{ U/gprot}$$

按照操作过程, 测定大鼠肝(10%匀浆蛋白浓度为10.29 gprot/L, 加样量20 μL)、大鼠肾(10%匀浆蛋白浓度为10.09 gprot/L, 加样量20 μL)、大鼠心(10%匀浆蛋白浓度为2.07 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	小心加样
		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。