

## 线粒体呼吸链复合物 II 活性测试盒

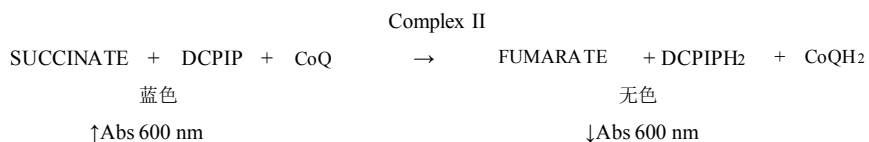
20 管/20 样

### 一、反应原理

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>），在分光光度仪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：



### 二、试剂组成：

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

### 三、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。

### 四、用户自备

比色皿：用于比色分析的容器

双波长分光光度仪：用于比色分析

培养箱：用于孵育反应物

### 五、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)、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、上下倾倒数次，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

## （二）、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

## 六、样品活性计算

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

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

(蛋白浓度可通过总蛋白定量考马斯亮蓝法试剂盒测定)