

CheKine™ Plus 线粒体呼吸链复合体 V 活性检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1891

规格: 48 T/48 S

96 T/96 S

批号: 见产品标签

	检测范围: 0.0313 -2 mM		灵敏度: 0.0313 mM
	适用样本: 动植物组织和细胞		
	保质期: -20℃, 避光保存 12 个月		

注意: 检测范围和灵敏度均为标准品, 需要根据样本情况折算为活性的检测范围和灵敏度。

01 背景与原理

线粒体呼吸链复合体 V (EC 7.1.2.2) 又称 F1F0-ATP 合酶, 由 F1 和 F0 两个亚单位组成, 是线粒体氧化磷酸化和叶绿体光合磷酸化合成 ATP 的关键酶, 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞的线粒体中。该酶利用呼吸链产生的质子电化学梯度催化 ATP 合成, 也可通过逆反应过程水解 ATP。

本试剂盒检测原理是线粒体呼吸链复合体 V 水解 ATP 产生 ADP 和 P_i , P_i 与钼酸铵在还原剂的作用下生成深蓝色的钼蓝, 测定其在 660 nm 处吸光度的变化即可计算样本中线粒体呼吸链复合体 V 的活性。

本试剂盒针对低活性样本场景定向优化酶偶联反应体系, 显著提升了试剂盒在低值浓度区间的检测性能; 同步精简组分数量和缩短反应时间, 进一步简化操作。本试剂盒可稳定适配高通量批量样本检测, 全方位解决了线粒体呼吸链复合体的检测难点。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Reagent I	60 mL	60 mL×2	4℃
Reagent II	48 mL	96 mL	4℃
Reagent III	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃, 避光保存
Reagent IV	4.8 mL	9.6 mL	4℃
Reagent V	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃, 避光保存
Reagent VI	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃, 避光保存
Reagent VII	20 mL	40 mL	4℃, 避光保存
Standard	1 mL	1 mL	4℃, 避光保存

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 660 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通酶标板
试剂	去离子水	试剂配制用
其他	匀浆器或研钵、恒温箱、冰盒、低温离心机、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 建议实验者自行建立标准曲线以提高结果准确度。如未自行建立标准曲线，可参考结果展示部分的典型标准曲线公式进行结果计算。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Reagent I	即用型	实验过程中冰上放置；4℃保存
Reagent II	即用型	实验过程中冰上放置；4℃保存
Working Reagent III	临用前配制；48 T 加入 1.2 mL 去离子水充分溶解，96 T 加入 2.4 mL 去离子水充分溶解	未用完的试剂分装后-20℃避光保存 1 个月，禁止反复冻融
Reagent IV	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Working Reagent V	临用前配制；48 T 加入 2.4 mL 去离子水充分溶解，96 T 加入 4.8 mL 去离子水充分溶解	未用完的试剂分装后-20℃避光保存 1 个月，禁止反复冻融
Working Reagent VI	临用前配制；48 T 加入 5 mL 去离子水充分溶解，96 T 加入 10 mL 去离子水充分溶解	未用完的试剂分装后-20℃避光保存 1 个月，禁止反复冻融
Reagent VII	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存
Standard	即用型；使用前平衡到室温	浓度为 10mM，4℃避光保存
工作液	临用前配制；按照每孔 200 μL（Working Reagent VI 40 μL：Reagent VII 160 μL，配制体积比 1：4）配制工作液，混合均匀	未用完的试剂分装后-20℃避光保存 3 天，禁止反复冻融。工作液应为浅黄色，若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染。配制工作液建议使用新的玻璃器皿或一次性塑料器皿

05-1-2 标准品配制

使用去离子水将 10 mM 的标准品稀释至终浓度为 2 mM、1 mM、0.5 mM、0.25 mM、0.125 mM、0.0625 mM、0.0313 mM 的标准品工作液。

标准品工作液	标准品 (μL)	去离子水 (μL)	浓度 (mM)
1	100 μL 10 mM	400	2
2	200 μL 2 mM	200	1
3	200 μL 1 mM	200	0.5
4	200 μL 0.5 mM	200	0.25
5	200 μL 0.25 mM	200	0.125
6	200 μL 0.125 mM	200	0.0625
7	200 μL 0.0625 mM	200	0.0313
空白	0	200	0

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本。样本尽量新鲜提取，如果不能马上使用，则把完整细胞或者分装的组织保存在-80℃，一个月内使用。样本提取用 Reagent II 重悬后，尽量当天检测，如果当天不能检测，可置于-20℃冻存 1 天。该试剂盒提取的样本也可以适用于 KTB1851、KTB1861、KTB1871 和 KTB1881 试剂盒（具体操作详见 FAQ）。

● 动植物组织或细胞样本：

1.称取约 0.1 g 组织样本或收集 5×10^6 个细胞，加入 1 mL Reagent I，用匀浆器或研钵冰浴匀浆（建议手动匀浆。如果一次性处理的样本数较多，可以使用机械匀浆（冰浴）提高效率，推荐参数设置为 40 Hz，匀浆 20 s，间隔 10 s，重复 3 次（3 mm 钢珠 2-3 颗）。植物样本直接进行机械匀浆可能存在酶活损失的情况，建议结合自身设备情况进行预实验评估或采用手动匀浆的方式。细胞样本也可采用冰浴超声波破碎处理，推荐参数设置为功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，超声 5 min。）。

2.离心匀浆液，4℃，600 g，离心 5 min，收集上清液至另一新的离心管中，舍弃沉淀。

3.再次离心上清，4℃，11000 g，离心 10 min，沉淀即为提取的线粒体，用作第 5 步操作。

4.上清液即为胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的线粒体呼吸链复合体 V（此步可选做，可用于判断线粒体提取效果）。

5.在沉淀中加入 800 μL Reagent II，用移液器小心吹打沉淀，充分重悬沉淀（避免用涡旋混匀仪剧烈混匀以免破坏复合体，后续步骤可使用涡旋混匀仪轻柔混匀），置于冰上待测。

05-3 实验步骤

1. 酶标仪准备：预热 30 min 以上，调节波长到 660 nm。

2. 酶促反应：在 EP 管中依次加入下列试剂，空白管和标准管不需要进行此步骤。

试剂	测定管 (μL)	对照管 (μL)
Reagent III	10	10
Reagent IV	40	40
样本	50	0
混匀后盖紧，37℃（哺乳动物及哺乳动物细胞）或 25℃（其它物种）准确孵育 15 min		
Reagent V	20	20
样本	0	50

3. 混匀后，室温（25℃），6000 g，离心 10 min，取上清液至新的 EP 管中待测（上清液-20℃可保存 1 天）。
4. 检测体系配制：在 96 孔板中按照如下方式操作（空白孔和标准孔只需做 1 次）。检测量大时，建议使用多通道移液器操作以提高加样速度。

试剂	空白孔 (μL)	标准孔 (μL)	测定孔 (μL)	对照孔 (μL)
上清液	0	0	40	40
去离子水	40	0	0	0
标准品	0	40	0	0
工作液	200	200	200	200

5. 混匀，室温静置 10 min。
6. 吸光度检测：在 660 nm 处读取吸光度值，分别标记为 A_{空白}、A_{标准}、A_{测定}和 A_{对照}。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn)进入“技术中心”查找“在线计算器”工具。



06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算 $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ ， $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{对照}$ 。

2. 标准曲线绘制

以标准品浓度为 y 轴， $\Delta A_{标准}$ 为 x 轴，绘制标准曲线。将 $\Delta A_{测定}$ 代入方程得到 y 值（mM）。

3. 样本线粒体呼吸链复合体 V 活性计算

● 按样本质量计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟产生 1 nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

上清中复合体 V 活性(U/g)=(y_{上清} × V_{酶促} × 10⁶) ÷ (V_样 ÷ V_{提取} × W) ÷ T = 160 × y_{上清} ÷ W

沉淀中复合体 V 活性(U/g)=(y_{沉淀} × V_{酶促} × 10⁶) ÷ (V_样 ÷ V_{重悬} × W) ÷ T = 128 × y_{沉淀} ÷ W

线粒体呼吸链复合体 V 总活性(U/g) = 160 × y_{上清} ÷ W + 128 × y_{沉淀} ÷ W

● 按细胞数量计算：

单位的定义：每 10^4 个细胞每分钟产生 1 nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

上清中复合体 V 活性($U/10^4$)= $(y_{\text{上清}} \times V_{\text{酶促}} \times 10^6) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times N) \div T = 160 \times y_{\text{上清}} \div N$

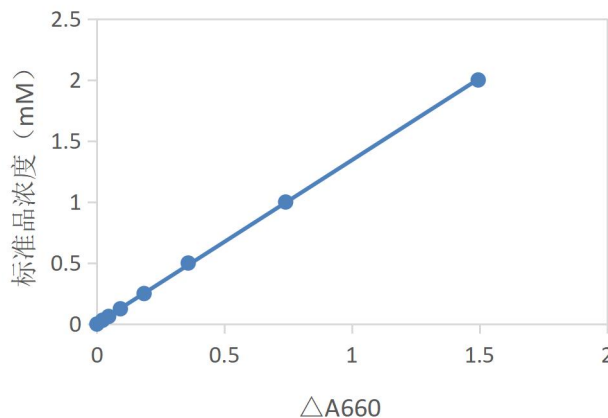
沉淀中复合体 V 活性($U/10^4$)= $(y_{\text{沉淀}} \times V_{\text{酶促}} \times 10^6) \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{重悬}} \times N) \div T = 128 \times y_{\text{沉淀}} \div N$

线粒体呼吸链复合体 V 总活性($U/10^4$)= $160 \times y_{\text{上清}} \div N + 128 \times y_{\text{沉淀}} \div N$

$V_{\text{酶促}}$ ：酶促反应体系总体积， 1.2×10^{-4} L； 10^6 ：单位换算系数， $1 \text{ mM} = 10^6 \text{ nM}$ ； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.05 mL； T ：反应时间，15 min； $V_{\text{提取}}$ ：提取体系体积，1 mL； W ：样本质量，g； $V_{\text{重悬}}$ ：重悬沉淀体积，0.8 mL； N ：细胞数量，以 10^4 为单位（如细胞数量为 5×10^6 ， $N=500$ ）。

07 结果展示

典型标准曲线： $y=1.3387x+0.0045$ ， $R^2=0.9999$



示例-1: 取 0.1 g 兔肝脏组织，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。分别测得： $\Delta A_{\text{上清}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 1.720 - 0.566 = 1.154$ ， $\Delta A_{\text{沉淀}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 1.483 - 0.580 = 0.903$ ，将 $\Delta A_{\text{上清}}$ 和 $\Delta A_{\text{沉淀}}$ 分别代入标准曲线方程，得到 $y_{\text{上清}} = 1.549$ 、 $y_{\text{沉淀}} = 1.213$ 。按样本质量分别计算得：上清中复合体 V 活性(U/g)= $160 \times y_{\text{上清}} \div W = 2478.4 \text{ U/g}$ ，沉淀中复合体 V 活性(U/g)= $128 \times y_{\text{沉淀}} \div W = 1552.64 \text{ U/g}$ ，总复合体 V 活性(U/g)= $160 \times y_{\text{上清}} \div W + 128 \times y_{\text{沉淀}} \div W = 2478.4 + 1552.64 = 4031.04 \text{ U/g}$ 。

08 FAQ

● 检测得到的样本 $\Delta A_{\text{测定}}$ 过高或者过低怎么办？

如果样本的 $\Delta A_{\text{测定}}$ 大于 2 mM 标准品的 $\Delta A_{\text{标准值}}$ ，则说明样本线粒体呼吸链复合体 V 活性太高，可用去离子水稀释酶促反应离心后的上清液，再重新进行测定，检测结果乘以稀释倍数。如果样本的 $\Delta A_{\text{测定}} < 0.02$ ，可适当增加上清液的加入体积，或增加加入的样本体积或提高样本量（组织克重或者细胞数量），再重新进行测定。若 $\Delta A_{\text{测定}}$ 出现负值，则说明样本中不含线粒体呼吸链复合体 V 或已降解。

● 为什么显色时上清看起来澄清透明，而沉淀看起来偏浑浊？

钼蓝是磷钼酸被还原后生成的纳米级胶体粒子，属于非分子分散的悬浊液（胶体体系）。样本沉淀中含有线粒体膜碎片、脂蛋白、细胞破碎颗粒等杂质微粒，这些微粒提供了异相成核的界面，促使钼蓝胶粒迅速吸附并发生团聚，形成尺寸较大的聚集体，从而对可见光产生强烈散射，外观呈现乳白色浑浊。上清液中杂质微粒极少，钼蓝胶粒缺乏凝结核，主要以单分散或小团聚体形式稳定存在，粒径远小于可见光波长，散射光很弱，因此溶液保持清澈透明。

● 同一样本，KTB1851、KTB1861、KTB1871、KTB1881 和 KTB1891 试剂盒都能检测，如何操作？

1.KTB1851、KTB1861、KTB1871、KTB1881 和 KTB1891 试剂盒的 Reagent I 和 Reagent II 可以分别互换使用，可任选其中一个试剂盒的 Reagent I 和 Reagent II 来制备样本。

- 2.称取约 0.1 g 组织样本或收集 5×10^6 个细胞，加入 1 mL Reagent I，用匀浆器或研钵冰浴匀浆（建议手动匀浆。如果一次性处理的样本数较多，可以使用机械匀浆（冰浴）提高效率，推荐参数设置为 40 Hz，匀浆 20 s，间隔 10 s，重复 3 次（3 mm 钢珠 2-3 颗）。植物样本直接进行机械匀浆可能存在酶活损失的情况，建议结合自身设备情况进行预实验评估或采用手动匀浆的方式。细胞样本也可采用冰浴超声波破碎处理，推荐参数设置为功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，超声 5 min。）。
- 3.离心匀浆液，4℃，600 g，离心 5 min，收集上清液至另一新的离心管中，舍弃沉淀。
- 4.再次离心上清，4℃，11000 g，离心 10 min，沉淀即为提取的线粒体，用作第 6 步操作。
- 5.上清液即为胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的线粒体呼吸链复合体 I -V（此步可选做，可用于判断线粒体提取效果）。
- 6.在沉淀中加入 200 μL Reagent II，用移液器吹起沉淀并小心吹打，充分重悬沉淀（避免用涡旋混匀仪剧烈混匀以免破坏复合体，后续步骤可使用涡旋混匀仪轻柔混匀），经第 7 步操作后置于冰上待测。
- 7.检测复合体 I、复合体 II、复合体 III 时，分别按 KTB1851、KTB1861、KTB1871 说明书的推荐稀释倍数用 Reagent II 进行样本的稀释；检测复合体 IV 时，先用 Reagent II 稀释 2 倍后再根据 KTB1881 说明书的推荐稀释倍数用 Reagent II 进行样本的稀释；检测复合体 V 时，用 Reagent II 稀释 4 倍后直接用于检测。

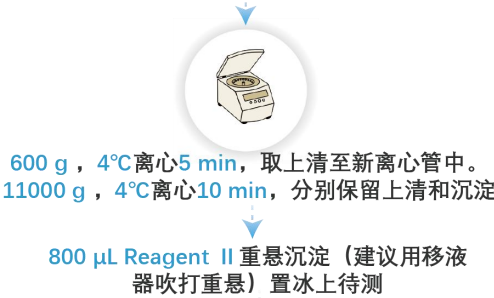
09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1851	CheKine™ Plus 线粒体呼吸链复合体 I 活性检测试剂盒（微量法）
KTB1861	CheKine™ Plus 线粒体呼吸链复合体 II 活性检测试剂盒（微量法）
KTB1871	CheKine™ Plus 线粒体呼吸链复合体 III 活性检测试剂盒（微量法）
KTB1881	CheKine™ Plus 线粒体呼吸链复合体 IV 活性检测试剂盒（微量法）

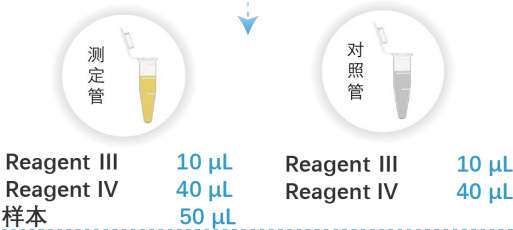
CheKine™ Plus 线粒体呼吸链复合体 V 活性检测流程示意图

(Abbkin 货号：KTB1891)

样本处理



工作液的配制：按照每孔 200 μL (Working Reagent VI 40 μL: Reagent VII 160 μL，配制体积比 1: 4) 配制工作液，混合均匀。配制好的工作液应为浅黄色，若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染。



混匀后盖紧，37℃（哺乳动物及哺乳动物细胞）或 25℃（其它物种）准确孵育 15 min



混匀后，室温（25℃），6000 g，离心 10 min，取上清液至新的 EP 管中待测

标准品配制



数据检测

