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]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)=$(y_{上清}\times V_{酶促}\times 10^6)\div(V_{样}\div V_{提取}\times W)\div T=\mathbf{160\times y_{上清}\div W}$

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

线粒体呼吸链复合体Ⅴ总活性(U/g) =$\mathbf{160\times y_{上清}\div W+128\times y_{沉淀}\div W}$

- 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)=($y_{上清}$×$V_{酶促}$×10^6)÷($V_{样}$÷$V_{提取}$×N)÷T=**160×$y_{上清}$÷N**

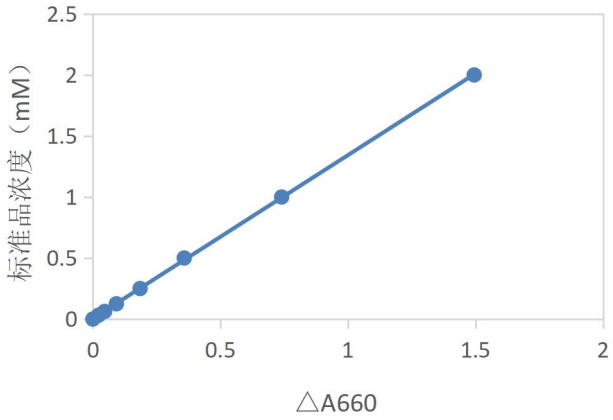
沉淀中复合体Ⅴ活性(U/10^4)=($y_{沉淀}$×$V_{酶促}$×10^6)÷($V_{样}$÷$V_{重悬}$×N)÷T=**128×$y_{沉淀}$÷N**

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

$V_{酶促}$：酶促反应体系总体积，1.2×10^{-4} L；10^6：单位换算系数，1 mM=10^6 nM；$V_{样}$：加入样本体积，0.05 mL；T：反应时间，15 min；$V_{提取}$：提取体系体积，1 mL；W：样本质量，g；$V_{重悬}$：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：$\Delta A_{上清}=A_{测定}-A_{对照}$=1.720-0.566=1.154，$\Delta A_{沉淀}=A_{测定}-A_{对照}$=1.483-0.580=0.903，将$\Delta A_{上清}$和$\Delta A_{沉淀}$分别代入标准曲线方程，得到 $y_{上清}$=1.549、$y_{沉淀}$=1.213。按样本质量分别计算得：上清中复合体Ⅴ活性(U/g)=160×$y_{上清}$÷W =2478.4 U/g，沉淀中复合体Ⅴ活性(U/g)=128×$y_{沉淀}$÷W=1552.64 U/g。

08 FAQ

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

如果样本的$\Delta A_{测定}$大于 2 mM 标准品的$\triangle A_{标准}$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$\Delta A_{测定}$<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$\Delta A_{测定}$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

（Abbkine 货号 ： KTB1891）

样本处理





称取约 0.1 g 组织样本加入1 mL Reagent Ⅰ，用匀浆器或研钵冰浴匀浆



收集清洗的细胞加入1 mL Reagent Ⅰ，用匀浆器或研钵冰浴匀浆



600 g，4℃离心5 min，取上清至新离心管中。
11000 g，4℃离心10 min，分别保留上清和沉淀

800 μL Reagent Ⅱ重悬沉淀（建议用移液器吹打重悬）置冰上待测



体系配置

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。





Reagent Ⅲ	10 μL	Reagent Ⅲ	10 μL
Reagent Ⅳ	40 μL	Reagent Ⅳ	40 μL
样本	50 μL		

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 μL	Reagent Ⅴ	20μL
		样本	50μL

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



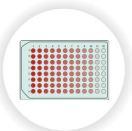






上清液	40μL	上清液	40μL	去离子水	40μL	标准品	40μL
工作液	200μL	工作液	200μL	工作液	200μL	工作液	200μL

数据检测



混匀后室温静置10 min，测定660 nm处吸光值
结果计算

V1.0