CheKine™ Plus 线粒体呼吸链复合体Ⅰ活性检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1851　　规格: 48 T/48 S　96 T/96 S　　批号：见产品标签

	适用样本：动植物组织和细胞
	保质期：-20℃，避光保存 12 个月

01 背景与原理

线粒体呼吸链复合体Ⅰ（EC1.6.5.3）又称 NADH-CoQ 还原酶或 NADH 脱氢酶，广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞的线粒体中，是线粒体内膜中最大的蛋白复合物。该酶催化一对电子从 NADH 传递给 CoQ，同时使 O_2 还原生成 O^{2-}，是线粒体呼吸电子传递链上产生 O^{2-}的主要步骤。该酶活性强弱不仅可以反映呼吸电子传递链状态，还可以反映活性氧的生成状态。

本试剂盒检测原理是线粒体呼吸链复合体Ⅰ能够催化 NADH 脱氢生成 NAD^+，测定 NADH 在 340 nm 处吸光度值的变化即可计算样本中线粒体呼吸链复合体Ⅰ的活性。

本试剂盒通过精准调控酶促反应动力学，有效延长反应的持续时间，消除了样本加样时间差带来的结果偏差，并提供了充裕的加样缓冲时间；同时采用预混工作液设计进一步简化操作。本试剂盒可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	30 mL	60 mL	4℃
Reagent Ⅲ	15 mL	30 mL	4℃，避光保存
Reagent Ⅳ	200 μL	400 μL	-20℃，避光保存
Reagent Ⅴ	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃，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 340 nm 处的吸光度
耗材	96 孔 UV 板	紫外透明板
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）。
- 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

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。
Reagent Ⅲ	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存。
Reagent Ⅳ	即用型；使用前平衡到室温	试剂易挥发，注意密封。有刺激性气味，建议在通风橱使用。-20℃避光保存。
Working Reagent Ⅳ	临用前配制；按照 Reagent Ⅲ：Reagent Ⅳ体积比 19：1 配制并混合均匀	按需配制，需现用现配，避光保存。加入 Reagent Ⅲ后迅速加入 Reagent Ⅳ。
Working Reagent Ⅴ	临用前配制；48 T 加入 3 mL Reagent Ⅲ，96 T 加入 6 mL Reagent Ⅲ，充分溶解	未用完的试剂分装后-20℃避光保存 1 个月，避免反复冻融

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本。样本尽量新鲜提取，如果不能当天提取，则把完整细胞或者分装的组织块保存在-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 KTB1861、KTB1871、KTB1881 和 KTB1891 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Ⅰ（此步可选做，可用于判断线粒体提取效果）。

5. 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 6 步操作后置于冰上待测。

6. **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用 Reagent Ⅱ稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，选择合适的稀释倍数，参考下表稀释(仅供参考):

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数	样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
细胞样本	不稀释	**小鼠脾脏组织**	1-2	**兔心脏组织**	不稀释	**兔肺脏组织**	不稀释
小鼠心脏组织	不稀释	**小鼠肺脏组织**	1-2	**兔脑组织**	不稀释	**兔肾脏组织**	2-4
小鼠脑组织	1-2	**小鼠肾脏组织**	2-4	**兔肝脏组织**	2-6	**兔肌肉组织**	不稀释
小鼠肝脏组织	6-10	**小鼠肌肉组织**	不稀释	**兔脾脏组织**	不稀释	**植物组织**	不稀释

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 340 nm。

2. **工作液配制**：按照每孔 200 μL（Reagent Ⅲ **139 μL**：Working Reagent Ⅴ **35 μL**：Working Reagent Ⅳ **26 μL**，配制体积比 **16：4：3**）配制工作液并混合均匀。需现用现配，避光保存。

3. **检测体系配制**：96 孔 UV 板中依次加入 10 μL 样本和 200 μL 工作液，**在 5 min 内完成全部加样操作不会影响检测结果。**检测量大时，建议使用多通道移液器操作以提高加样速度。

4. **吸光度检测**：迅速混匀后读取 340 nm 处 0 min 时的吸光值 A_1，置于 37℃孵育 2 min（酶标仪有温控功能的将温度调节至 37℃），读取 2 min 时的吸光值 A_2。

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$\Delta A_{上清}=A1_{上清}-A2_{上清}$，$\Delta A_{沉淀}=A1_{沉淀}-A2_{沉淀}$。

2. 样本线粒体呼吸链复合体Ⅰ活性计算

- 按样本质量计算

酶活性单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

上清中复合体Ⅰ活性(U/g)=$[\Delta A_{上清}\times V_{反总}\div(\varepsilon\times d)\times 10^9]\div(W\div V_{提取}\times V_{样})\div T$**=3376×**$\Delta A_{上清}$**÷W**

沉淀中复合体Ⅰ活性(U/g)=$[\Delta A_{沉淀}\times V_{反总}\div(\varepsilon\times d)\times 10^9]\div(W\div V_{重悬}\times V_{样})\div T$**=675×**$\Delta A_{沉淀}$**÷W**

复合体Ⅰ总活性(U/g) =**3376×ΔA $_{上清}$÷W+675×ΔA $_{沉淀}$÷W**

- 按细胞数量计算

酶活性单位的定义：每 10^4 个细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

上清中复合体Ⅰ活性(U/10^4)=[ΔA $_{上清}$×V $_{反总}$÷(ε×d)×10^9]÷(V $_{样}$÷V $_{提取}$×N)÷T=**3376×ΔA $_{上清}$÷N**

沉淀中复合体Ⅰ活性(U/10^4)=[ΔA $_{沉淀}$×V $_{反总}$÷(ε×d)×10^9]÷(V $_{样}$÷V $_{重悬}$×N)÷T=**675×ΔA $_{沉淀}$÷N**

复合体Ⅰ总活性(U/10^4) =**3376×ΔA $_{上清}$÷N+675×ΔA $_{沉淀}$÷N**

V $_{反总}$：反应体系总体积，2.1×10^{-4} L；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L/mol/cm；d：96 孔 UV 板光径，0.5 cm；10^9：单位换算系数，1 mol=10^9 nmol；V $_{样}$：加入样本体积，0.01 mL；T：反应时间，2 min；W：样本质量，g；V $_{提取}$：提取体系体积，1 mL；V $_{重悬}$：重悬沉淀体积，0.2 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

示例-1：取 0.1g 兔子脾脏样本，按照测定步骤操作，用 96 孔 UV 板进行检测。测得ΔA $_{上清}$=A$_{1\ 上清}$-A$_{2\ 上清}$=1.053-0.948=0.105，ΔA $_{沉淀}$=A$_{1\ 沉淀}$-A$_{2\ 沉淀}$=1.04-0.888=0.152，按样本质量计算得：上清中复合体Ⅰ活性(U/g)=3376×ΔA $_{上清}$÷W=3376×0.105÷0.1=3544.8 U/g，沉淀中复合体Ⅰ活性(U/g)=675×ΔA $_{沉淀}$÷W=675×0.152÷0.1=1026 U/g。

08 FAQ

- **检测得到的样本ΔA 过高或者过低怎么办?**

如果样本的ΔA>0.4，则说明样本中线粒体呼吸链复合体Ⅰ活性较高，需用 Reagent Ⅱ适当稀释，再重新进行测定。如果样本的ΔA<0.01，可适当增大加入的样本体积或提高样本量（组织克重或者细胞数量），或者减少提取液用量，再重新进行测定。若ΔA 出现负值，则说明样本中不含线粒体呼吸链复合体Ⅰ或已降解。

- **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
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）
KTB1891	CheKine™ Plus 线粒体呼吸链复合体Ⅴ活性检测试剂盒（微量法）

CheKine™ Plus 线粒体呼吸链复合体 I 活性检测流程示意图

（Abbkine 货号：KTB1851）

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

200 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

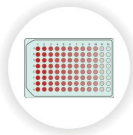
工作液的配制：按照每孔200 µL（Reagent III 139 µL：Working Reagent V 35 µL：Working Reagent IV 26 µL，配制体积比16：4：3）配制工作液并混合均匀。需现用现配，避光保存。



样本	10 µL
工作液	200 µL

在5 min内完成全部加样操作不会影响检测结果

数据检测



迅速混匀后读取340 nm处0 min时的吸光值A1，置于37℃孵育2 min（酶标仪有温控功能的将温度调节至37℃），读取2 min时的吸光值A2

结果计算

V1.0